



Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ciencias Veterinarias

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada,

Facultad de Ciencias Veterinarias - UNL

Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), UNL-CONICET

***“Influencia del estado metabólico en bovinos con enfermedad
quística ovárica: Análisis de mecanismos de señalización
involucrados en la respuesta a insulina”***

Tesis presentada para optar por el grado académico de

Doctora en Ciencias Veterinarias

Autor: M.V. Natalia Carolina Gareis

Director: Dra. Florencia Rey

Codirector: Dr. Gustavo Juan Hein

2019

“Conozca todas las teorías. Domine todas las técnicas. Pero al tocar un alma humana sea apenas otra alma humana”.

Carl G. Jung

Dedicada a....

Mis padres, Yoly y Cuchi, y mi hermano, Gaby, presentes en cada momento, son el sostén de mi vida y mis ejemplos a seguir.

Agradecimientos

- *A mis viejos, por incentivar me a estudiar y a hacer lo que me gusta, por su honestidad, simpleza y amor incondicional.*
- *A mi hermano, Gabi, por ser con su humildad y amor, un salvavidas.*
- *A Uriel, por el aguante y por acompañarme en este camino.*
- *A Hugo Ortega por darme la posibilidad de integrar este grupo de trabajo, desde hace ya casi 10 años.*
- *A Florencia Rey y Natalia Salvetti, por tener confianza en mí, y motivarme en este camino de la investigación.*
- *A Gustavo, por brindarse siempre con predisposición.*
- *A Mati Stangaferro y Pablito Díaz, por ser mis mentores de campo, mis compañeros y amigos, por todos los momentos compartidos.*
- *A Fer, Aye, Meli, que desde mis inicios me formaron en el laboratorio.*
- *A Emi por sus aportes y colaboración para la realización de esta tesis.*
- *A Anto, gracias amiga por todo la ayuda que me brindas siempre, para la tesis, para la vida.*
- *A Valen, por su amistad y por el aguante de siempre.*
- *A los integrantes de la Cátedra de Teriogenología, Luciano, Nacho, Fabián y Martín, que marcaron mis primeros pasos en el camino de la reproducción animal.*
- *A todos mis compañeros del ICiVet, por el trabajo y los buenos momentos compartidos.*
- *A mis papás postizos de la FCV, José Bertoli y Eduardo Baravalle, quienes siempre me abrieron las puertas para trabajar juntos, proyectar y tomar mates de por medio.*
- *A la peña de las pi, gracias por las risas, los chistes, los abrazos y por brindarme el hombro cada vez que lo necesité. Las quiero!!*
- *A mis amigos/as de ayer, de hoy y de siempre. De acá y de allá.*
- *A Ernesto Quercia, por la colaboración y la amistad.*
- *A mi querida Facultad, que me brindó la dicha de conocer hermosas personas y amistades que perdurarán en el tiempo.*
- *Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca que me permitió realizar los estudios de posgrado en la carrera del Doctorado en Ciencias Veterinarias.*

- *A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por otorgarnos los subsidios necesarios para el desarrollo de este trabajo de Tesis.*

INDICE GENERAL

Abreviaturas utilizadas	I
Índice de Tablas	V
Índice de Figuras	VI
Resumen	XVI
Abstract	XVII

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Anatomía, histología y fisiología del ovario	3
1.1.1. Ciclo estral bovino.....	4
1.1.2. Dinámica folicular durante el ciclo estral	6
1.1.3. Regulación del ciclo estral.....	8
1.2. Enfermedad quística ovárica	10
1.2.1. Definición de EQO.....	10
1.2.2. Etiología, patogenia y factores predisponentes.....	12
1.2.3. Disfunción hipotálamo-hipofisaria.....	13
1.2.4. Disfunción ovárica-folicular	15
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	18
2.1. Hipótesis	19
2.2. Objetivo general.....	19
2.3. Objetivos específicos	19
3. CAPÍTULO I: Alteración en las vías de señalización de insulina y su efecto sobre la esteroidogénesis en vacas con EQO	20
3.1. CAPÍTULO I: Introducción	21
3.1.1. Insulina: conceptos generales.....	22
3.1.1.1. Vías de señalización de la insulina	23
3.1.1.1.1. Vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt.....	24
3.1.1.1.2. Vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK)	27
3.1.1.2. Efectos generales de la insulina	28

3.1.1.3. Insulina en rumiantes	29
3.1.1.4. Rol de la insulina en el ovario	30
3.1.2. Esteroidogénesis.....	32
3.1.2.1. Regulación de la esteroidogénesis por las gonadotrofinas	35
3.1.3. Efecto de la insulina sobre la esteroidogénesis	36
3.1.4. Quistes ováricos	38
3.2. CAPÍTULO I: Materiales y métodos.....	39
3.2.1. Procedimientos generales efectuados con animales	40
3.2.1.1. Animales y grupos de estudio	40
3.2.1.1.1. Grupo control	40
3.2.1.1.2. Grupo EQO espontánea.....	42
3.2.1.1.3. Grupo proveniente de frigorífico.....	42
3.2.1.2. Seguimiento de los cambios ováricos mediante ultrasonografía.....	43
3.2.1.3. Obtención de muestras: grupos control y EQO	44
3.2.1.3.1. Obtención de sangre	44
3.2.1.3.2. Obtención de líquido folicular.....	45
3.2.1.3.3. Obtención de ovario completo.....	46
3.2.1.4. Obtención de muestras: grupo frigorífico	47
3.2.1.4.1. Obtención de ovario completo.....	47
3.2.1.4.2. Obtención de líquido folicular.....	48
3.2.2. Procesamiento de muestras	48
3.2.2.1. Procesamiento de las muestras para RT-PCR.....	50
3.2.2.2. Procesamiento de las muestras para western blot.....	51
3.2.2.3. Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas.....	52
3.2.3. Cuantificación de hormonas en suero y líquido folicular	52
3.2.3.1. Determinación de 17 β -estradiol, progesterona y testosterona.....	52
3.2.3.2. Determinación de insulina	53
3.2.4. Evaluación semicuantitativa de la expresión génica de panAkt, mTOR, StAR, 3 β -HSD, CYP19A1, CYP17A1	53
3.2.4.1. Diseño de cebadores específicos.....	53
3.2.4.2. Procesamiento del ADNc.....	54
3.2.4.3. Análisis de las poblaciones foliculares	54
3.2.4.5. Amplificación mediante PCR en tiempo real.....	55

3.2.4.6. Análisis de la secuencia nucleotídica	56
3.2.5. Detección y cuantificación de intermediarios de la cascada de señalización de insulina y esteroidogénesis.....	57
3.2.5.1. Western blot	57
3.2.5.2. Inmunohistoquímica indirecta	59
3.2.5.2.1. Análisis digital de imágenes.....	62
3.2.5.2.2. Clasificación de los folículos ováricos	62
3.2.6. Evaluación estadística.....	64
3.3. CAPÍTULO I: Resultados	65
3.3.1. Cuantificación de hormonas esteroides	66
3.3.2. Cuantificación de insulina	66
3.3.3. Expresión génica de panAkt, mTOR, StAR, 3 β -HSD, CYP19A1 y CYP17A1 ...	67
3.3.3.1. Expresión génica de panAkt	67
3.3.3.2. Expresión génica de mTOR	68
3.3.3.3. Expresión génica de StAR	69
3.3.3.4. Expresión génica de 3 β -HSD	70
3.3.3.5. Expresión génica de CYP19A1	70
3.3.3.6. Expresión génica de CYP17A1	71
3.3.4. Expresión y localización proteica de p-ERK 1/2, panAkt, p-mTOR	71
3.3.4.1. Expresión proteica y localización de p-ERK 1/2	72
3.3.4.1.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	72
3.3.4.1.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	74
3.3.4.2. Expresión proteica y localización de panAkt.....	75
3.3.4.2.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	76
3.3.4.2.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	78
3.3.4.3. Expresión proteica y localización de p-mTOR.....	79
3.3.4.3.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	79
3.3.4.3.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	81
3.3.5. Expresión y localización proteica de StAR, 3 β -HSD, CYP19A1 y CYP17A1...	82
3.3.5.1. Expresión proteica y localización de StAR.....	82
3.3.5.1.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	82
3.3.5.1.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	84
3.3.5.2. Expresión proteica y localización de 3 β -HSD	85

3.3.5.2.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	86
3.3.5.2.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos	87
3.3.5.3. Expresión proteica y localización de CYP19A1 y CYP17A1	88
3.3.5.3.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	89
3.3.5.3.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos	92
3.4. CAPÍTULO I: Discusión.....	95
3.4.1. Cascada de señalización de insulina y su implicancia en vacas con EQO.....	96
3.4.2. Relación entre las alteraciones en la cascada de insulina con la esteroidogénesis	98
4. CAPÍTULO II: Alteración en las vías de señalización de insulina en un modelo de persistencia folicular inducida	101
4.1. CAPÍTULO II: Introducción.....	102
4.2. CAPÍTULO II: Materiales y métodos	107
4.2.1. Procedimientos generales efectuados con animales	108
4.2.1.1. Animales y grupos de estudio	108
4.2.1.1.1. Grupo control	108
4.2.1.1.2. Grupos con persistencia folicular inducida	108
4.2.1.2. Modelo experimental	109
4.2.1.3. Monitoreo de los cambios ováricos	110
4.2.1.4. Obtención de muestras	110
4.2.1.4.1. Toma de muestras de sangre.....	110
4.2.1.4.2. Aspiración de líquido folicular guiada por ecografía	111
4.2.1.4.3. Ovariectomía: mediante colpotomía	111
4.2.2. Procesamiento de muestras	112
4.2.3. Cuantificación insulina en suero y líquido folicular	113
4.2.4. Detección y cuantificación de intermediarios de la cascada de señalización de insulina en el modelo de persistencia folicular.....	113
4.2.4.1. Análisis por western blot.....	113
4.2.4.2. Inmunohistoquímica indirecta	114
4.2.5. Evaluación estadística.....	115
4.3. CAPÍTULO II: Resultados	116
4.3.1. Cuantificación de insulina	117
4.3.2. Expresión y localización proteica de IR, p-IR, IRS1, p-IRS1, PI3K, panAkt y p- panAkt.....	117

4.3.2.1. Expresión proteica y localización del IR.....	118
4.3.2.1.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	118
4.3.2.1.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	122
4.3.2.2. Expresión proteica y localización del p-IR.....	124
4.3.2.2.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	124
4.3.2.2.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	128
4.3.2.3. Expresión proteica y localización de IRS1	130
4.3.2.3.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	130
4.3.2.3.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	134
4.3.2.4. Expresión proteica y localización del p-IRS1.....	136
4.3.2.4.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	136
4.3.2.4.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	141
4.3.2.5. Expresión proteica y localización de la PI3K	143
4.3.2.5.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	143
4.3.2.5.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	147
4.3.2.6. Expresión proteica y localización de panAkt	149
4.3.2.6.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	149
4.3.2.6.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	154
4.3.2.7. Expresión proteica y localización del p-panAkt.....	156
4.3.2.7.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	156
4.3.2.7.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	160
4.3.3. Relación entre la expresión de proteínas fosforiladas y totales	162
4.4. CAPÍTULO II: Discusión	164
5. CAPÍTULO III: Alteraciones en sensores metabólicos clave involucrados en la EQO	171
5.1. CAPÍTULO III: Introducción	172
5.1.1. Influencia del balance energético negativo sobre la ovulación y la EQO	174
5.1.2. Descripción de algunos metabolitos en líquido folicular	175
5.1.2.1. Glucosa.....	176
5.1.2.2. Triglicéridos.....	177
5.1.2.3. Colesterol	179
5.1.2.4. Ácidos grasos no esterificados.....	179
5.1.2.5. Beta-hidroxibutirato.....	181

5.1.4. Beta-oxidación en el ovario	181
5.1.5. Adiponectina.....	182
5.1.5.1. Receptores y vías de acción	183
5.1.5.2. Efectos de la adiponectina.....	186
5.1.5.3. Relación de la adiponectina con trastornos reproductivos.....	186
5.2. CAPÍTULO III: Materiales y métodos.....	188
5.2.1. Procedimientos generales efectuados con animales	189
5.2.1.1. Animales y grupos de estudio	189
5.2.1.1.1. Grupo control	189
5.2.1.1.2. Grupo EQO	189
5.2.1.2. Obtención de muestras	190
5.2.2. Procesamiento de muestras	190
5.2.3. Detección y cuantificación de metabolitos en plasma y líquido folicular ...	191
5.2.4. Detección y cuantificación de adiponectina, sus receptores e intermediarios	191
5.2.4.1. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	191
5.2.4.2. Western blot	192
5.2.4.3. Inmunohistoquímica indirecta	192
5.2.5. Evaluación estadística.....	193
5.3. CAPÍTULO III: Resultados.....	195
5.3.1. Identificación y caracterización de los animales con EQO.....	196
5.3.2. Concentración de AGNE en líquido folicular y plasma.....	197
5.3.3. Concentración de glucosa en líquido folicular y plasma	197
5.3.4. Concentración de triglicéridos en líquido folicular y plasma.....	198
5.3.5. Concentración de BHB en líquido folicular y sangre.....	199
5.3.6. Concentración de colesterol en líquido folicular y plasma.....	199
5.3.7. Concentración de adiponectina en líquido folicular y plasma	200
5.3.8. Expresión y localización proteica de AdipoR1, AdipoR2 y AMPK	201
5.3.8.1. Expresión proteica y localización de AdipoR1	201
5.3.8.1.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	201
5.3.8.1.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	203
5.3.8.2. Expresión proteica y localización de AdipoR2	204
5.3.8.2.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	205

5.3.8.2.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	207
5.3.8.3. Expresión proteica y localización de AMPK	208
5.3.8.3.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	208
5.3.8.3.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	210
5.3.9. Expresión y localización proteica CPT1 y ACOX1	211
5.3.9.1. Expresión proteica y localización de CPT-1	212
5.3.9.1.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	212
5.3.9.1.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	214
5.3.9.2. Expresión proteica y localización de ACOX1.....	215
5.3.9.2.1. Análisis de foliculogénesis por grupo	216
5.3.9.2.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos.....	218
5.4. CAPÍTULO III: Discusión.....	220
5.4.1. Análisis de metabolitos y β -oxidación en el ovario	221
5.4.2. Señalización de adiponectina y su implicancia en la EQO.....	223
6. CONCLUSIONES FINALES.....	226
7. BIBLIOGRAFÍA	231

ABREVIATURAS UTILIZADAS

11β-HSD 1	11 β -hidroxiesteroide-dehidrogenasa 1
11β-HSD 2	11 β -hidroxiesteroide-dehidrogenasa 2
17OH-P4	17 α -hidroxiprogesterona
17OH-P5	17 α -hidroxipregnenolona
17β-HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3β-HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
ACOX1	Acetil-CoA oxidasa 1
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica/adrenocorticotrofina
AdipoR1	Receptor 1 de adiponectina
AdipoR2	Receptor 2 de adiponectina
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
AGV	Ácidos grasos volátiles
Akt	Proteína quinasa B (PKB)
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BEN	Balance energético negativo
BHB	Betahidroxibutirato
CC	Condición corporal
CL	Cuerpo lúteo
CPT1	Carnitin palmitoil transferasa 1
CYP17A1	Citocromo P450 17 α -hidroxilasa
CYP19A1	Citocromo P450 aromatasa
D0	Día de ovulación
DHEA	Dehidroepiandrosterona
E₂	Estrógeno / 17 β -estradiol
ECLIA	Electroquimioluminiscencia
EEM	Error estándar de la media
EQO	Enfermedad Quística Ovárica

ERK	Quinasa tipo MEK regulada por señal extracelular
ESR	Receptor de estrógenos
ESR-1	Receptor de estrógenos 1
ESR-2	Receptor de estrógenos 2
FOXO	Factor de transcripción de forkhead
FSH	Hormona foliculoestimulante
FSHR	Receptor de FSH
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosín difosfato
GLUT	Transportador de glucosa dependiente de insulina
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
GTP	Guanosín trifosfato
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFR	Receptor de IGF
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LF	Líquido folicular
LH	Hormona luteinizante
LHCGR	Receptor de hormona luteinizante/coriogonadotrofina
LHR	Receptor de LH
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
P0	Día de persistencia 0
P10	Día de persistencia 10
P15	Día de persistencia 15
P5	Día de persistencia 5
panAkt	Akt 1/2/3

PCOS	Síndrome del ovario poliquístico
PDK1	Quinasa dependiente de fosfatidilinositol
p-ERK1/2	ERK 1/2 fosforilado
PGF2α	Prostaglandina F 2 alfa
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
p-IR	IR fosforilado
p-IRS1	IRS1 fosforilado
PKA	Proteína quinasa A
p-panAkt	panAkt fosforilada
PPARs	Receptor nuclear activador de la proliferación peroxisomal
PPARγ	Receptor nuclear activador de la proliferación peroxisomal gamma
PT	Periodo de transición
RIA	Radioinmunoanálisis
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa
StAR	Proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TG	Triglicéridos
TSC1	Complejo de esclerosis tuberosa 1
TSC2	Complejo de esclerosis tuberosa 2
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
ZP	Zona pelúcida

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Pares de cebadores (secuencia de cebadores forward/reverse, 5'→3') usados para PCR en tiempo real.....	57
Tabla 2: Anticuerpos, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de western blot.....	59
Tabla 3: Anticuerpos, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.....	61
Tabla 4: Clasificación morfológica de folículos ováricos más empleada para bovinos. ...	63
Tabla 5: Concentración de 17 β -estradiol, progesterona y testosterona en suero y líquido folicular de animales control (folículo preovulatorio, proestro) y con EQO espontánea.	66
Tabla 6: Anticuerpos, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de Western blot.....	114
Tabla 7: Anticuerpos, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.....	115
Tabla 8: Anticuerpos, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de Western blot.....	192
Tabla 9: Anticuerpos, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.....	193

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de un corte longitudinal de ovario	3
Figura 2: Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento.....	4
Figura 3: Reclutamiento, selección y dominancia en un patrón de tres ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino.	5
Figura 4: Esquema de los cambios en las concentraciones hormonales y la dinámica de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino.	8
Figura 5: Folículo quístico en ovario bovino obtenido de playa de faena.	12
Figura 6: Esquema de un islote pancreático.	22
Figura 7: Esquema de la pro-insulina.	23
Figura 8: Esquema del receptor de insulina.....	25
Figura 9: Vía de señalización PI3K/Akt activada por el receptor de insulina.....	27
Figura 10: Vía de señalización de la MAPK, activada por el receptor de insulina.....	28
Figura 11: Esquema de esteroidogénesis en el ovario.....	35
Figura 12: Protocolo de sincronización de celo utilizado en el grupo control	41
Figura 13: imágenes ultrasonográficas de ovarios con un folículo preovulatorio.....	41
Figura 14: Imágenes ultrasonográficas de ovarios con presencia de quistes foliculares.	42
Figura 15: Pares de ovarios obtenidos de frigorífico	43
Figura 16: (A) Ecógrafo portátil (Honda HS101V). (B) Técnica de ultrasonografía transrectal.....	44
Figura 17: Técnica de extracción de sangre de vasos coccígeos.	45
Figura 18: Técnica de aspiración folicular.....	46
Figura 19: Técnica de ovariectomía bilateral, abordaje por flanco izquierdo.....	47
Figura 20: Aspiración manual de líquido folicular de ovarios provenientes de frigorífico	48
Figura 21: Esquema de la procedencia y destino de las muestras obtenidas.....	50
Figura 22: Concentración de insulina en líquido folicular (LF) y suero en animales de los grupos control y EQO espontánea.....	67

Figura 23: Niveles de ARNm correspondientes a panAkt en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y quistes foliculares espontáneos (Q)	68
Figura 24: Niveles de ARNm correspondiente a mTOR en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y quistes foliculares espontáneos (Q)	69
Figura 25: Niveles de ARNm correspondiente a StAR en células de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y quistes foliculares espontáneos (Q).	69
Figura 26: Niveles de ARNm correspondiente a 3 β -HSD en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y quistes foliculares espontáneos (Q).	70
Figura 27: Niveles de ARNm correspondiente a CYP19A1 en células de la granulosa de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y quistes foliculares espontáneos (Q).	71
Figura 28: Niveles de ARNm correspondiente a CYP17A1 de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y quistes foliculares espontáneos (Q).	71
Figura 29: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de p-ERK 1/2 en los grupos control y EQO	72
Figura 30: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-ERK1/2 en diferentes categorías foliculares del grupo control.....	73
Figura 31: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-ERK1/2 en diferentes categorías foliculares del grupo EQO	74
Figura 32: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de p-ERK1/2 en células de la granulosa de cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio.....	75
Figura 33: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-ERK1/2 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO).	75
Figura 34: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de panAkt en los grupos control y EQO	76
Figura 35: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo control	77

Figura 36: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo EQO	77
Figura 37: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de Akt en células de la granulosa y de la teca de cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio.....	78
Figura 38: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO).....	78
Figura 39: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de p-mTOR en los grupos control y EQO	79
Figura 40: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-mTOR en diferentes categorías foliculares del grupo control	80
Figura 41: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-mTOR en diferentes categorías foliculares del grupo EQO	80
Figura 42: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de mTOR en células de la granulosa y de la teca de cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio.....	81
Figura 43: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-mTOR en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO).....	81
Figura 44: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de StAR en los grupos control y EQO	83
Figura 45: Imágenes representativas de la inmunomarcación de StAR en diferentes categorías foliculares del grupo control	83
Figura 46: Imágenes representativas de la inmunomarcación de StAR en diferentes categorías foliculares del grupo EQO	84
Figura 47: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de StAR en células de la granulosa y de la teca de cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio.....	85
Figura 48: Imágenes representativas de la inmunomarcación de StAR en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO).....	85
Figura 49: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de 3 β -HSD en los grupos control y EQO	86
Figura 50: Imágenes representativas de la inmunomarcación de 3 β -HSD en diferentes categorías foliculares del grupo control	86

Figura 51: Imágenes representativas de la inmunomarcación de 3β -HSD en diferentes categorías foliculares del grupo EQO	87
Figura 52: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de 3β -HSD en células de la granulosa y de la teca de cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio.....	88
Figura 53: Imágenes representativas de la inmunomarcación de 3β -HSD en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO).....	88
Figura 54: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de CYP19A1 en los grupos control y EQO	89
Figura 55: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CYP19A1 en diferentes categorías foliculares del grupo control	90
Figura 56: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CYP19A1 en diferentes categorías foliculares del grupo EQO	90
Figura 57: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de CYP17A1 en el grupo EQO.....	91
Figura 58: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CYP17A1 en diferentes categorías foliculares del grupo control	91
Figura 59: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CYP17A1 en diferentes categorías foliculares del grupo EQO	92
Figura 60: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de CYP19A1 en células de la granulosa de cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio.....	93
Figura 61: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CYP19A1 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO).....	93
Figura 62: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de CYP17A1 en células de la teca cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio.....	94
Figura 63: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-ERK1/2 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO).....	94
Figura 64: (A) Imágenes ecográficas representativas del folículo preovulatorio y con una persistencia de 0, 5, 10 y 15 días. (B) Imágenes microscópicas representativas de la pared folicular de los folículos preovulatorios de las vacas control y folículos con 0, 5, 10 y 15 días de persistencia folicular de vacas tratadas.....	105

Figura 65: Diseño experimental para la inducción de persistencia folicular.....	110
Figura 66: Ovariectomía bilateral por colpotomía	112
Figura 67: Esquema de la procedencia y destino de las muestras obtenidas.....	113
Figura 68: Concentración de insulina en líquido folicular (LF) y suero en animales de los grupos control, P0 (0 días de persistencia), P5 (5 días de persistencia), P10 (10 días de persistencia) y P15 (15 días de persistencia).....	117
Figura 69: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del IR en los diferentes grupos.....	119
Figura 70: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR en diferentes categorías foliculares del grupo control	120
Figura 71: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR en diferentes categorías foliculares del grupo P0.....	120
Figura 72: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR en diferentes categorías foliculares del grupo P5.....	121
Figura 73: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR en diferentes categorías foliculares del grupo P10	121
Figura 74: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR en diferentes categorías foliculares del grupo P15	122
Figura 75: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del IR en células de la granulosa de los diferentes grupos.....	123
Figura 76: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del IR en células de la teca de los diferentes grupos.....	123
Figura 77: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR en los diferentes grupos. A) Folículo preovulatorio del grupo control	124
Figura 78: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-IR en los diferentes grupos.....	125
Figura 79: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IR en diferentes categorías foliculares del grupo control	126
Figura 80: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IR en diferentes categorías foliculares del grupo P0.....	126
Figura 81: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IR en diferentes categorías foliculares del grupo P5.....	127

Figura 82: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IR en diferentes categorías foliculares del grupo P10	127
Figura 83: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IR en diferentes categorías foliculares del grupo P15	128
Figura 84: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-IR en células de la granulosa de los diferentes grupos.....	129
Figura 85: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-IR en células de la teca de los diferentes grupos.	129
Figura 86: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IR en los diferentes grupos.....	130
Figura 87: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del IRS1 en los diferentes grupos.....	131
Figura 88: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo control	132
Figura 89: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P0.....	132
Figura 90: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P5.....	133
Figura 91: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P10	133
Figura 92: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P15.....	134
Figura 93: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del IRS1 en células de la granulosa de los diferentes grupos.....	135
Figura 94: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del IRS1 en células de la teca de los diferentes grupos.....	135
Figura 95: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IRS1 en los diferentes grupos. A) Folículo preovulatorio del grupo control.	136
Figura 96: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-IRS1 en los diferentes grupos.....	138
Figura 97: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo control	139

Figura 98: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P0.....	139
Figura 99: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P5.....	140
Figura 100: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P10	140
Figura 101: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P15	141
Figura 102: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-IRS1 en células de la granulosa de los diferentes grupos.....	142
Figura 103: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-IRS1 en células de la teca de los diferentes grupos.	142
Figura 104: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS1 en los diferentes grupos.....	143
Figura 105: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del PI3K en los diferentes grupos.	144
Figura 106: Imágenes representativas de la inmunomarcación de PI3K en diferentes categorías foliculares del grupo control	145
Figura 107: Imágenes representativas de la inmunomarcación de PI3K en diferentes categorías foliculares del grupo P0.....	145
Figura 108: Imágenes representativas de la inmunomarcación de PI3K en diferentes categorías foliculares del grupo P5.....	146
Figura 109: Imágenes representativas de la inmunomarcación de PI3K en diferentes categorías foliculares del grupo P10.....	146
Figura 110: Imágenes representativas de la inmunomarcación de PI3K en diferentes categorías foliculares del grupo P15	147
Figura 111: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del PI3K en células de la granulosa de los diferentes grupos	148
Figura 112: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del PI3K en células de la teca de los diferentes grupos.	148
Figura 113: Imágenes representativas de la inmunomarcación de PI3K en los diferentes grupos.....	149

Figura 114: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del panAkt en los diferentes grupos.....	151
Figura 115: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo control	152
Figura 116: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P0.....	152
Figura 117: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P5.....	153
Figura 118: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P10	153
Figura 119: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P15	154
Figura 120: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del panAkt en células de la granulosa de los diferentes grupos.....	155
Figura 121: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del panAkt en células de la teca de los diferentes grupos.	155
Figura 122: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en los diferentes grupos.....	156
Figura 123: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-panAkt en los diferentes grupos.	157
Figura 124: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo control.....	158
Figura 125: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P0	158
Figura 126: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P5	159
Figura 127: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P10	159
Figura 128: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P15	160
Figura 129: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-panAkt en células de la granulosa de los diferentes grupos.. ...	161

Figura 130: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-panAkt en células de la teca de los diferentes grupos	161
Figura 131: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-panAkt en los diferentes grupos.....	162
Figura 132: Relación entre la expresión de proteínas fosforiladas y totales para IR, IRS1 y panAkt.....	163
Figura 133: Interacción entre la selección genética para la producción de leche y la fertilidad.....	174
Figura 134: Esquema de un folículo antral, destacando sus componentes principales.	176
Figura 135: Esquema de las diferentes lipoproteínas encontradas en sangre.	178
Figura 136: Esquema de multimerización de adiponectina.	183
Figura 137: Vías de señalización de adiponectina mediante la activación de sus receptores y respuesta esperada en base a la vía activada.	185
Figura 138: Esquema de la procedencia y destino de las muestras obtenidas.	190
Figura 139: Condición corporal y producción láctea a 305 días en ambos grupos (control y EQO).	196
Figura 140: Concentración de AGNE en líquido folicular (LF) y plasma de animales control y con EQO espontánea.....	197
Figura 141: Concentración de glucosa en líquido folicular (LF) y plasma de animales control y con EQO espontánea.....	198
Figura 142: Concentración de triglicéridos en líquido folicular (LF) y plasma de animales control y con EQO espontánea.....	198
Figura 143: Concentración de BHB en líquido folicular (LF) y sangre de animales control y con EQO espontánea.....	199
Figura 144: Concentración de colesterol en líquido folicular (LF) y plasma de animales control y con EQO espontánea.....	200
Figura 145: Concentración de adiponectina en líquido folicular (LF) y plasma de animales control y con EQO espontánea.....	200
Figura 146: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AdipoR1 en los grupos control y EQO	202
Figura 147: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AdipoR1 en diferentes categorías foliculares del grupo control.....	202

Figura 148: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AdipoR1 en diferentes categorías foliculares del grupo EQO	203
Figura 149: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AdipoR1 en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) de los grupos control y EQO.....	204
Figura 150: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AdipoR1 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO).....	204
Figura 151: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AdipoR2 en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM.....	205
Figura 152: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AdipoR2 en diferentes categorías foliculares del grupo control.....	206
Figura 153: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AdipoR2 en diferentes categorías foliculares del grupo EQO	206
Figura 154: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AdipoR2 en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) de los grupos control y EQO.....	207
Figura 155: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AdipoR2 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO).....	207
Figura 156: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMPK en los grupos control y EQO.....	208
Figura 157: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AMPK en diferentes categorías foliculares del grupo control	209
Figura 158: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AMPK en diferentes categorías foliculares del grupo EQO	210
Figura 159: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMPK en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) de los grupos control y EQO.....	211

Figura 160: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AMPK en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO).....	211
Figura 161: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de CPT1 en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM.....	212
Figura 162: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CPT1 en diferentes categorías foliculares del grupo control	213
Figura 163: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CPT1 en diferentes categorías foliculares del grupo EQO	214
Figura 164: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de CPT1 en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) de los grupos control y EQO	215
Figura 165: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CPT1 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO).....	215
Figura 166: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de ACOX1 en los grupos control y EQO	216
Figura 167: Imágenes representativas de la inmunomarcación de ACOX1 en diferentes categorías foliculares del grupo control	217
Figura 168: Imágenes representativas de la inmunomarcación de ACOX1 en diferentes categorías foliculares del grupo EQO	218
Figura 169: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de ACOX1 en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) de los grupos control y EQO	219
Figura 170: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CPT1 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO).....	219

RESUMEN

A lo largo del ciclo productivo las vacas lecheras sufren cambios extremos en su metabolismo capaces de afectar la reproducción. El periodo posparto es una de las etapas críticas en la cual existe un desbalance energético, metabólico y hormonal. Asociados a los desequilibrios mencionados es frecuente el desarrollo de la enfermedad quística ovárica (EQO) que es un trastorno multifactorial que afecta el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal y posee como signo principal la anovulación. El objetivo de esta tesis fue analizar mecanismos moleculares que involucran intermediarios de la cascada de señalización de insulina, así como sensores nutricionales claves y su posible participación en el desarrollo de la EQO. Además, se realizaron estudios sobre un modelo de persistencia folicular para evaluar los estadios iniciales al desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, se estudiaron hormonas y metabolitos a nivel sistémico y folicular, y su metabolización en el ovario con la potencialidad de modular su función. Los resultados mostraron una expresión alterada de las moléculas intermediarias de la vía de señalización de la insulina, cuya acción podría modular la síntesis de las hormonas esteroidogénicas, entre otras. Asimismo se determinó una alteración en la expresión de las enzimas esteroidogénicas y en la concentración de progesterona en el suero y el líquido folicular. En animales con EQO detectamos alteraciones en la expresión de sensores nutricionales claves, así como en las concentraciones locales y sistémicas de diversos metabolitos. Dichas alteraciones apoyan la hipótesis de que los factores sistémicos podrían alterar el escenario local en el folículo, generando un microambiente adverso para la reanudación de la actividad ovárica, posiblemente causando la persistencia de los folículos, desarrollo de la EQO y su recurrencia. Estos datos aportan nuevos conocimientos para dilucidar la etiopatogenia de este trastorno, así como herramientas para una mejor comprensión del desarrollo de la enfermedad, mejorando así las posibilidades de diagnóstico, tratamiento, y consecuentemente, la eficiencia reproductiva de los rodeos.

ABSTRACT

Dairy cows suffer extreme changes in their metabolism throughout the productive cycle that can affect reproduction. The postpartum period is one of the critical stages characterized by an energy, metabolic and hormonal imbalance and are frequently associated with the development of the cystic ovarian disease (COD). The COD is a multifactorial disorder that affects the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, with anovulation as a main sign. The aim of this thesis was to analyze molecular mechanisms that involve intermediaries of the insulin-signaling cascade, as well as key nutritional sensors and their possible participation in COD development. In addition, studies were conducted on a follicular persistence model to evaluate the initial stages of the disease development. On the other hand, at systemic and follicular level, hormones and metabolites were determined, as well as their metabolization in the ovary that potentially can modulate their ovarian functionality. The results showed an altered expression of the intermediate molecules of the insulin-signaling pathway, whose action could modify the synthesis route of the steroidogenic hormones, among others. Moreover, an alteration in the expression of the steroidogenic enzymes and in the concentration of progesterone in the serum and the follicular fluid was determined. Alterations in the expression of key nutritional sensors, as well as in the local and systemic concentrations of various metabolites, were detected in animals with COD. These alterations support the hypothesis that the systemic factors could alter the local scenario in the follicle, generating an adverse microenvironment for the resumption of ovarian activity, possibly leading the persistence of the follicles, development of the COD and its recurrence. These results provide new insights to elucidate the etiopathogenesis of this disorder, as well as tools for a better understanding of the disease, thus improving the possibilities of diagnosis, treatment, and consequently, the reproductive efficiency of dairy farms.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Uno de los objetivos en los sistemas de producción lecheros es lograr una reproducción eficiente, debido a la gran incidencia que posee sobre la rentabilidad de los mismos. Sin embargo, los sistemas lecheros actuales se caracterizan por el bajo rendimiento reproductivo; frecuentemente asociado a la intensificación de la producción y al aumento de la producción de leche (Butler, 2000; Royal y col., 2000; Lucy y col., 2001; Berry y col., 2014).

Las vacas lecheras sufren alteraciones metabólicas asociadas a etapas adaptativas durante toda su vida (nacimiento, destete, parto), pero principalmente durante el periodo de transición (PT). El PT es aquel que transcurre desde tres semanas antes del parto hasta tres o cuatro semanas posteriores al mismo, y se caracteriza por modificaciones endocrinas importantes que preparan a las hembras para el parto y la lactogénesis (Drackley, 1999). El PT es crítico debido a las complicaciones relacionadas con los cambios metabólicos, fisiológicos y anatómicos que condicionan la reanudación de la actividad ovárica posparto (Sordillo y Aitken, 2009). La mayoría de las vacas lecheras durante el periparto, experimentan un periodo de resistencia a la insulina, reducción en la ingesta alimentaria, balance energético negativo (BEN), lipólisis incrementada con la consecuente pérdida de peso (al inicio de la lactancia), hipocalcemia, y reducción de la función inmunológica (Leblanc, 2010). Por otra parte, luego de la reanudación ovárica posparto, las vacas continúan siendo susceptibles a sufrir alteraciones en sus ciclos estrales con un fuerte impacto negativo sobre la reproducción general de los rodeos. Uno de los trastornos reproductivos más importantes durante esta etapa es la enfermedad quística ovárica (EQO). La EQO se asocia a diversos factores entre los que se destacan los trastornos metabólicos. Es por ello que existe un interés creciente por estudiar la relación existente entre ciertas hormonas y metabolitos con la etiopatogenia de esta enfermedad.

A continuación y a modo de introducción se describen generalidades de la fisiología normal del ciclo estral en el bovino y una breve descripción de la EQO, para luego desarrollar los tres capítulos que integran esta tesis.

1.1. Anatomía, histología y fisiología del ovario

Los ovarios son glándulas mixtas, con funciones endócrinas (esteroidogénesis) y exócrinas (gametogénesis) esenciales para la reproducción en las hembras. Los procesos de biosíntesis y desarrollo celular se llevan a cabo en un ambiente muy complejo, dónde factores endocrinos, paracrinos y autocrinos se interrelacionan para lograr una correcta regulación de estos acontecimientos (Field, 2014). En el bovino, los ovarios miden normalmente de 3,5 a 4 cm de longitud y 2,5 cm de ancho (Sisson y Grossman, 1982). En esta especie, están conformados por una médula interna y una corteza externa, rodeada por una capa de tejido conectivo denso llamada túnica albugínea, y ésta a su vez se encuentra cubierta por el epitelio germinativo (epitelio cuboidal superficial) (Hafez y Hafez, 2000) (Figura 1).

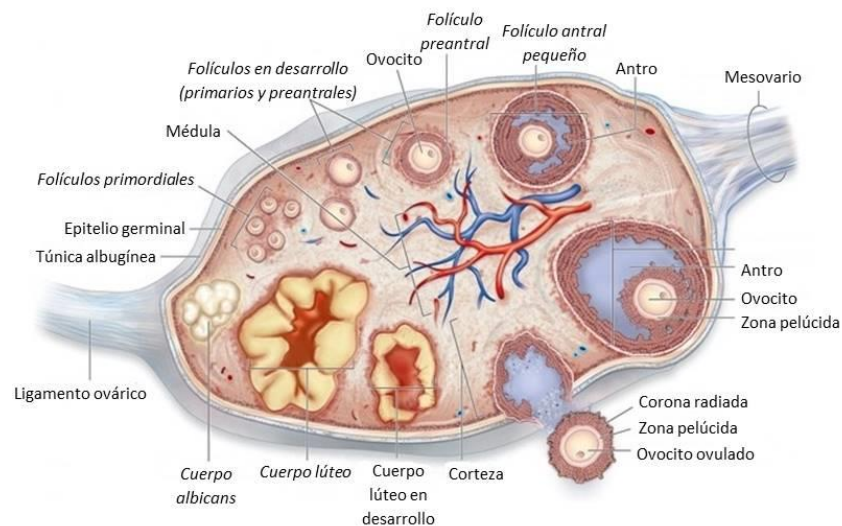


Figura 1: Esquema de un corte longitudinal de ovario donde se observan las distintas categorías foliculares en crecimiento, ovulación y formación de cuerpo lúteo. Adaptado de Enciclopedia Británica, 2007.

En la *corteza* se encuentran folículos en distintos estadios de desarrollo, cuerpos hemorrágicos, cuerpos lúteos (cuerpos amarillos) y cuerpos albicans (cuerpos blancos) inmersos en una malla de tejido conectivo muy celular que da sostén y origina varios componentes de los folículos (células tecales) y posteriores cuerpos lúteos (células luteínicas pequeñas). La *médula* está compuesta principalmente por tejido conectivo en la que se encuentran gran cantidad de fibras nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos

(Dellmann, 1994). En el ovario adulto, los ovocitos (gametos) se encuentran rodeados por una o más capas de células que cumplen múltiples funciones como: protección, nutrición y sostén y crecen gradualmente en número formando eventualmente un folículo esférico lleno de líquido (Geneser, 2005) (Figura 2).

El *folículo* es una unidad fisiológica equilibrada cuyo funcionamiento y estructura dependen de factores sistémicos y locales, los que conducen a una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares en sus diversos componentes: el *ovocito*, las *células de la granulosa* y las *células de la teca* (Hafez y Hafez, 2000).

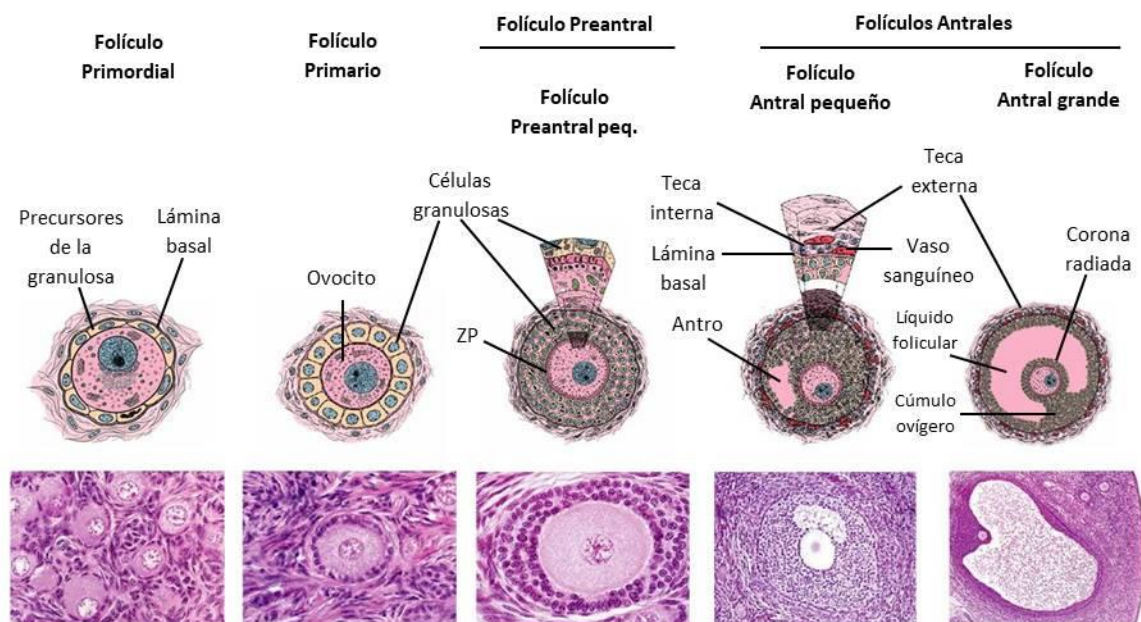


Figura 2: Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento. En la parte superior se esquematizan los folículos indicando sus componentes; en la parte inferior se muestran cortes histológicos de los mismos teñidos con hematoxilina-eosina. ZP: zona pelúcida. Adaptado de Ross y col., 2004.

1.1.1. Ciclo estral bovino

El ciclo estral bovino tiene una duración promedio de 21 días (rango: 17-25) y se produce en forma continua a lo largo del año, por lo que se clasifica a esta especie como poliéstrica continua (Hafez y Hafez, 2000). Durante el ciclo estral, las hembras bovinas, pasan de un periodo no receptivo a uno de receptividad que finalmente permite el apareamiento y la subsecuente preñez.

El ciclo consiste en dos fases principales: la fase lútea (14-18 días) y la fase folicular (4-6 días). La fase lútea es el período que sigue a la ovulación y es donde se presenta un cuerpo lúteo (CL) estructural y funcionalmente completo, mientras que la fase folicular es el período que sigue a la lisis del CL (luteólisis) hasta la ovulación. Durante la fase folicular ocurre la maduración final y la ovulación del folículo preovulatorio.

Además, podemos dividir el ciclo en 4 etapas: *estro* (período corto en el cual se produce el comportamiento de “celo”), *metaestro* (etapa donde se produce la ovulación), *diestro* (etapa donde el CL es funcional) y *proestro* (etapa donde se produce el crecimiento final del folículo preovulatorio) (Forde y col., 2011).

Los ciclos del bovino se presentan típicamente con dos o tres ondas de crecimiento, sin embargo también se han podido observar ciclos con una o cuatro ondas (De Rensis y Peters, 2002). La primera onda de crecimiento del ciclo emerge en el día de la ovulación (D0). En un patrón de dos ondas, la onda siguiente se produce a los 9-10 días; en un patrón de tres ondas las próximas ondas se producen a los 8-9 y 15-16 días (De Rensis y Peters, 2002; Mapletoft y col., 2003) (Figura 3). En consecuencia, las ondas de crecimiento se desarrollan tanto durante la fase folicular como en la fase lútea del ciclo estral. Cada onda de crecimiento se puede subdividir en una fase de reclutamiento, una de selección y una de dominancia (Figura 3).

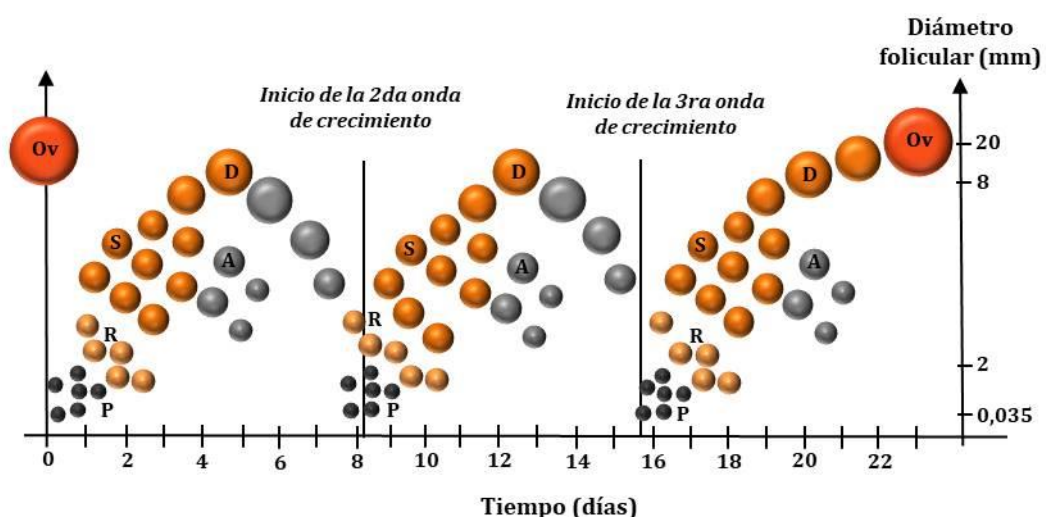


Figura 3: Reclutamiento, selección y dominancia en un patrón de tres ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. P: Folículo primordial, reserva ovárica. R: Reclutamiento. S: Selección. D: Dominancia. A: Atresia. Ov: Ovulación. Adaptado de Aerts y Bols 2010b.

1.1.2. Dinámica folicular durante el ciclo estral

Durante el desarrollo fetal se establece un número fijo de folículos primordiales. El crecimiento de los folículos ováricos toma un período de 3-4 meses y está dividido en una etapa independiente y otra dependiente de gonadotrofinas (Webb y col., 2004). El crecimiento dependiente de gonadotrofinas en las hembras bovinas ocurre en 2 o 3 ondas de crecimiento folicular por ciclo estral (Rajakoski, 1960; Savio y col., 1988). Cada onda de crecimiento abarca el *reclutamiento, selección y dominancia* folicular, seguido por la atresia o la ovulación del folículo dominante. El comienzo de la etapa dependiente de gonadotrofinas está caracterizado por el reclutamiento de una cohorte de folículos, unos 5-20 folículos de un tamaño mayor o igual a 5 mm, que está en relación con un incremento transitorio en las concentraciones de FSH (Adams y col., 1992; Sunderland y col., 1994). Este suceso marca el comienzo de la dependencia de FSH de los folículos en crecimiento (Ginther y col., 2002), con la aparición de receptores de FSH (FSHR) localizados en las células de la granulosa al tercer día del inicio de la onda de crecimiento (Camp y col., 1991; Evans y Fortune, 1997). Así, la FSH estimula su cascada de señalización corriente abajo para finalmente promover el crecimiento folicular y la proliferación celular (Richards, 1994; Richards y col., 1998). Este efecto de la FSH sobre las células de la granulosa lleva al incremento en la actividad de la enzima aromatasa, la cual convierte los andrógenos en estrógenos (Hillier, 1994). De esta cohorte de folículos en desarrollo emerge el folículo dominante, que es el folículo sano de mayor diámetro en dicha cohorte (Gougeon y Lefèvre, 1983). El aumento en su tamaño lleva a un incremento en la cantidad de E₂ e inhibina contenidas en su líquido folicular (Hillier, 1994). Las concentraciones altas de E₂ e inhibina ejercen retroalimentación negativa a nivel adenohipofisario reduciendo la FSH a niveles basales (Sunderland y col., 1994; Ginther y col., 2000a; Ginther, 2000b). Este efecto negativo de los estrógenos sobre LH y FSH podría tener como objetivo las células bi-hormonales (FSH y LH), directamente a nivel adenohipofisario, disminuyendo por diversos mecanismos el contenido de FSH de estas células, pasando a ser células monohormonales de LH que se suman a la población monohormonal de LH no afectada por los E₂. Estos cambios explican la capacidad de las células gonadotrofas de reservar concentraciones elevadas de LH para promover el pico preovulatorio de dicha hormona (Molter-Gérard y col., 2000). El folículo dominante se vuelve cada vez más sensible a la LH (Ginther y col., 2000b) y continúa creciendo a pesar

de la disminución en las concentraciones de FSH. El cambio de un crecimiento dependiente de FSH (Adams y col., 1992) a uno dependiente de LH (Kulick y col., 1999) se lleva a cabo por la presencia del receptor de LH (LHR) en las células de la granulosa (Xu y col., 1995). Este receptor está localizado en las células de la granulosa y de la teca interna de folículos sanos, en diferentes estadios del desarrollo folicular (Camp y col., 1991). A medida que el folículo crece, aumentan los LHR de las células de la teca y las células de la granulosa los adquieren, resultando ser seleccionados para llegar a ser el/los folículos dominantes de esa onda de crecimiento (Xu y col., 1995; Bao y col., 1997; Braw-Tal y Roth, 2005). Por otra parte, se ha sugerido que incrementos transitorios en las concentraciones de LH circulante que ocurren durante o alrededor del momento de selección folicular (Ginther y col., 2003), permite al folículo dominante continuar la producción de E_2 y crecer en un medio con bajas concentraciones de FSH (Ireland y Roche, 1983). Durante la fase luteal temprana se dan pulsos de LH de menor amplitud y mayor frecuencia (20–30 pulsos/24 h), en la mitad de la fase lútea (mitad de diestro) los pulsos incrementan su amplitud y reducen su frecuencia (6–8 pulsos/24 h). En ambos casos los pulsos son de una amplitud y frecuencia insuficiente para lograr la maduración y ovulación del folículo dominante (Rahe y col., 1980), por lo que el folículo dominante sufre atresia, disminuyen las concentraciones de E_2 e inhibina y queda abolida la retroalimentación negativa que ejercía sobre el eje hipotálamo-hipofisario y aumenta la secreción de FSH, conduciendo a la emergencia de una nueva onda de crecimiento folicular (Figura 4). La producción de altas concentraciones de E_2 es una característica distintiva del folículo dominante (Ireland y Roche, 1982, 1983) y antes de que aparezcan diferencias visibles en el diámetro folicular, este futuro folículo dominante tiene mayores concentraciones de E_2 en el líquido folicular comparado con los demás folículos en su cohorte (Fortune, 1994; Sunderland y col., 1994; Mihm y col., 2000).

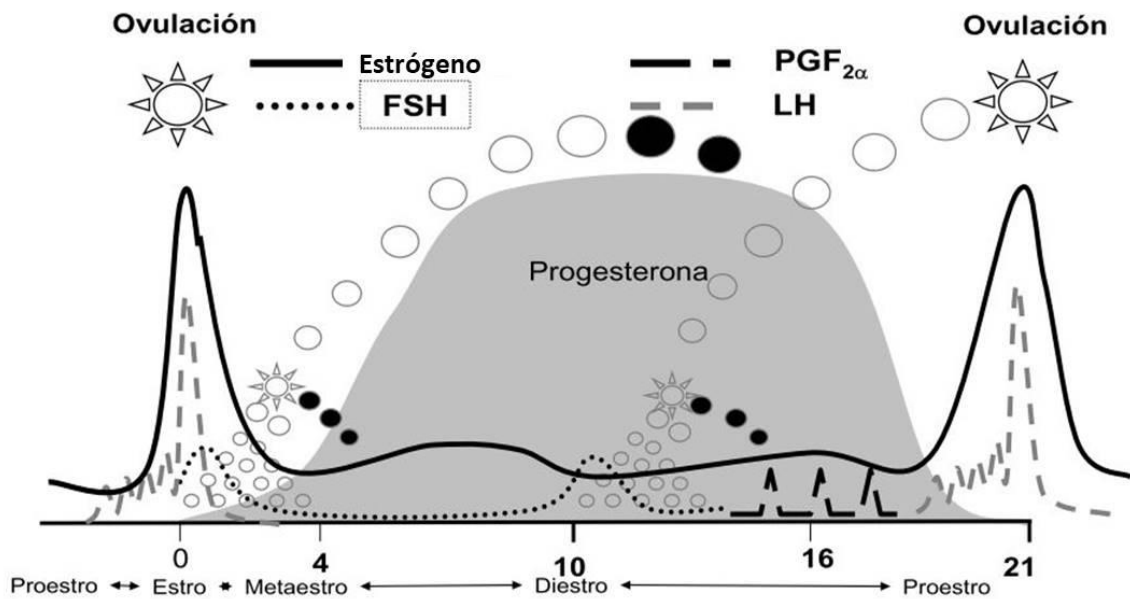


Figura 4: Esquema de los cambios en las concentraciones hormonales y la dinámica de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. FSH: hormona foliculoestimulante. LH: hormona luteinizante. PGF $_{2\alpha}$: prostaglandina F $_{2\alpha}$. Adaptado de Rippe, 2009.

1.1.3. Regulación del ciclo estral

El ciclo estral se encuentra regulado por diversas hormonas y factores, principalmente por las hormonas del hipotálamo (hormona liberadora de gonadotrofinas; GnRH, del inglés: gonadotropin releasing hormone), la adenohipófisis (hormona foliculoestimulante; FSH, del inglés: follicle stimulating hormone y hormona luteinizante; LH, del inglés: luteinizing hormone), los ovarios (progesterona; P $_4$, 17 β -estradiol; E $_2$ e inhibina) y el útero (prostaglandina F $_{2\alpha}$; PGF $_{2\alpha}$). Estas hormonas funcionan a través de mecanismos de retroalimentación (negativa y positiva) ejerciendo el control del ciclo estral (Roche, 1996). La GnRH regula la secreción de LH y FSH a través de sus acciones sobre la adenohipófisis. Después del transporte de GnRH desde el hipotálamo a la hipófisis, vía el sistema porta hipofisario (Moenter, 1992), la GnRH se une a un receptor de membrana acoplado a proteína G presente en las células gonadotrofas (Kakar y col., 1993) y de esta manera se produce la liberación de FSH y LH desde compartimentos de almacenaje citoplasmáticos (Weck y col., 1998).

Durante la fase folicular, un incremento en las concentraciones de E $_2$ a causa del rápido crecimiento y proliferación celular que sufre el folículo dominante, sumado a la

caída concomitante de los niveles circulantes de P_4 debido a la luteólisis, inducen un pico de GnRH y permiten la aparición de conducta sexual y la receptividad a la monta (Frandsen y Wilke, 2009). Este pico preovulatorio de GnRH estimula picos coincidentes de FSH y LH (Sunderland y col., 1994). Solamente cuando la P_4 se encuentra en concentraciones séricas basales y los pulsos de LH se suceden cada 40-70 min por 2-3 días, el folículo dominante puede ovular (Roche, 1996), la ovulación se da 10 a 14 hs después de comenzado el estro y es seguida por el comienzo de la fase luteal. Este período también es conocido como metaestro y tiene una duración de 3-4 días. Está caracterizado por la formación del CL a partir del cuerpo hemorrágico (folículo ovulado). Luego de la ovulación, las concentraciones de P_4 comienzan a incrementarse debido a la formación del CL, en el cual las células de la granulosa y de la teca interna se luteinizan y producen P_4 que permitirá el establecimiento y mantenimiento de la preñez o la reanudación de un nuevo ciclo estral en el caso de no existir fertilización del ovocito (Niswender y col., 1981). Durante el diestro, la P_4 se mantiene elevada y se suceden repetidamente ondas de crecimiento folicular, estimuladas por la liberación de FSH desde la adenohipófisis. Sin embargo, los folículos dominantes que crecen durante esta fase no llegan a ovular. La P_4 , que es dominante en esta fase, ejerce retroalimentación negativa y sólo permite la secreción de pulsos de LH de gran amplitud pero de baja frecuencia que no logran desencadenar la ovulación del folículo dominante (Rahe y col., 1980). Finalmente durante el proestro, la P_4 disminuye debido al proceso de luteólisis a partir de la secreción de $PGF2\alpha$ desde el útero (Hansel y Convey, 1983).

Existen factores intraováricos que son muy importantes en la regulación del ciclo estral y pueden actuar directamente sobre el eje hipotálamo-hipofisario, o indirectamente alterando por ejemplo la síntesis de estrógenos. Algunos de éstos son: la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$, del inglés: transforming growth factor beta) (Phillips y De Kretser, 1998; Findlay y col., 2002; Knight y Glister, 2003), el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1, del inglés: insulin like growth factor 1) (Mihm y col., 2000; Rivera y Fortune, 2003; Canty y col., 2006; Lucy, 2007) y la insulina que ejerce efectos directos e indirectos sobre la esteroidogénesis y el crecimiento de las células foliculares (Spicer y col., 2002; Bossaert y col., 2010) y en la cual nos extenderemos en esta tesis.

1.2. Enfermedad quística ovárica

Dentro de los trastornos reproductivos que afectan a los bovinos, la EQO constituye una de las causas más frecuentes de infertilidad y subfertilidad en vacas lecheras de alta producción. Esta enfermedad puede presentarse en cualquier etapa de la lactancia (Bartolome y col., 2005), siendo más frecuente en el posparto (Vanholder y col., 2006). La incidencia de EQO en los rodeos lecheros varía de un 5 a un 30 % (Vanholder y col., 2006; Cattaneo y col., 2014; Ortega y col., 2015). El impacto económico de la EQO se encuentra en relación directa con el alargamiento de los intervalos parto-concepción y parto-parto (Silvia y col., 2002; Peter, 2004), estimándose que cada evento de la enfermedad agrega entre 22 y 64 días al intervalo parto-concepción. A esto se le suma una mayor tasa de descarte de animales enfermos y un aumento directo en los costos en tratamientos veterinarios (Probo y col., 2011).

1.2.1. Definición de EQO

La EQO ha sido definida de numerosas maneras o con diferentes criterios a lo largo de los años. Silvia y col. (2002) definieron a los quistes foliculares como estructuras foliculares, con un diámetro mínimo de 17 mm, que persisten en el ovario más de 6 días en ausencia de CL y que interfieren con la ciclicidad ovárica normal. Por su parte, Wiltbank y col. (2002) los definen como estructuras foliculares con un diámetro mayor o igual a 20 mm, con una persistencia de al menos 7 días en ausencia de CL. En el 2006, Vanholder y col. los definieron como folículos de un diámetro de al menos 20 mm, presentes en uno o ambos ovarios en ausencia de cualquier tejido luteal activo y con interferencia de la ciclicidad ovárica normal. Sumándose a estas definiciones, Bartolomé y col. (2005) establecieron una definición que permite realizar un correcto diagnóstico a campo de la enfermedad, sin la necesidad de hacer dos controles para definir el estado de persistencia folicular, definieron a la EQO como la presencia de uno o múltiples folículos ováricos, en uno o ambos ovarios, de un diámetro de 18 mm o más, en ausencia de CL y con falta de tonicidad uterina a la palpación. La incorporación del concepto de tonicidad uterina es clave para diferenciar un folículo preovulatorio de un quiste, y se basa en las características del útero durante el proestro, en el cual aumentan los

receptores de oxitocina y, por ende, aumenta también la tonicidad en respuesta a las altas concentraciones de estrógenos. En el caso de quistes foliculares, la falla en la ovulación y la persistencia por varios días determinan la pérdida de los receptores de oxitocina y, por consiguiente, la falta de tonicidad.

Los quistes ováricos son estructuras dinámicas que pueden persistir, luteinizarse o atresarse. Además, de manera similar a lo que ocurre en vacas con ciclos estrales normales, las vacas con EQO tienen ondas de crecimiento folicular que pueden terminar en una ovulación espontánea o en la formación de otro quiste (Cook y col., 1990; Hamilton y col., 1995; Garverick, 1997; Bartolome y col., 2005). Asimismo, es frecuente la aparición de vacas con 2 o más quistes ováricos (Silvia y col., 2002) al momento de la detección.

Los quistes surgen como resultado de la anovulación de un folículo preovulatorio. En circunstancias normales, la anovulación es seguida por atresia o luteinización, y posteriormente el folículo regresa. En la EQO el folículo evita este proceso, aumentando en tamaño y persistiendo en el ovario (Ortega y col., 2016). Los diámetros de los quistes foliculares suelen ir desde 2,5 a 7,5 cm, pero es más frecuente encontrarlos dentro de un rango de 2,5 a 3,0 cm (Eyestone y Ax, 1984). Macroscópicamente, los quistes se pueden clasificar en quistes foliculares y luteínicos, que se consideran formas diferentes del mismo trastorno (Opsomer y col., 1996). La determinación de las concentraciones de progesterona en plasma, leche o grasa de la leche puede ayudar a hacer una distinción entre los dos tipos de quistes. Los quistes foliculares pueden secretar o no, pequeñas cantidades de progesterona, mientras que los quistes luteínicos secretan progesterona en cantidades variables (Garverick, 1997). Los quistes foliculares suelen tener paredes delgadas y secretan grandes cantidades de E₂. A su vez, según estudios histológicos, los quistes foliculares se clasifican en quistes con o sin células de la granulosa (Isobe y Yoshimura, 2007). Durante la formación del quiste, la degeneración inicial de las células de la granulosa es seguida por la degeneración del ovocito y la teca interna, y este hecho conduce a la falla de la ovulación de un folículo antral ovulatorio. Las células de la granulosa experimentan picnosis y cariorrexis y finalmente desaparecen de la cavidad del quiste (Ortega y col., 2016). Las células de la teca interna sufren una picnosis con posterior fibrosis de la pared del quiste. La luteinización de la teca interna, cuando ocurre, varía de pequeñas áreas aisladas a espesas, localizadas usualmente en la base del quiste en la profundidad del ovario (Brown y col., 1982). Incluso, en la primera etapa de

persistencia, el espesor de la granulosa disminuye significativamente (Díaz y col., 2015). (Figura 5).



Figura 5: Folículo quístico en ovario bovino obtenido de playa de faena.

1.2.2. Etiología, patogenia y factores predisponentes

La EQO es considerada una “enfermedad multifactorial” debido a los numerosos factores clínicos, medioambientales y hereditarios que intervienen en su desarrollo (Peter, 2004). La hipótesis más aceptada en la actualidad acerca de la patogenia de la EQO involucra un desequilibrio neuroendocrino a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Por lo que la causa primaria de la enfermedad podría ser una deficiencia en el pico preovulatorio de LH o un patrón de liberación aberrante de dicha hormona (Peter, 2004; Vanholder y col., 2006). A la falla de la funcionalidad hipotálamo-hipofisaria se le suman componentes intraováricos que ocasionarían la disfunción de este órgano (Silvia y col., 2002; Ortega y col., 2015).

Dentro de los factores predisponentes se describen *factores generales* y *específicos*. Algunos *factores generales* descritos en la bibliografía son: herencia (Kesler y Garverick, 1982; Hooijer y col., 2001); alta producción de leche (Bartlett y col., 1986; Laporte y col., 1994; Rajala y Gröhn, 1998; Hooijer y col., 2001); edad, la tasa de EQO aumenta con la edad (Garverick, 1997; Peter, 2004); período de lactancia, la incidencia es mayor entre 40-150 días después del parto (Bierschwal, 1966; Romaniuk, 1972) o entre 31-60 días y entre 120-210 días después del parto (Bartlett y col., 1986; Bartolome y col., 2005); condición corporal (CC), animales con CC superior a 4 (escala de

0 a 5) suelen presentar quistes con una frecuencia 2,5 veces superior respecto a aquellas vacas cuya CC es menor o igual a 3 (Salveti y col., 2007a); estacionalidad, tiene una distribución variable según la estación del año (Bartlett y col., 1986; Garverick, 1997; López-Gatius y col., 2002; Peter, 2004; Nelson y col., 2010). Dentro de los *factores específicos* se describen la alimentación, la privación aguda de energía está asociada a la supresión de la liberación pulsátil de LH (Diskin y col., 2003); otras enfermedades incluyendo: mastitis clínica, retención de placenta, endometritis, metritis, hipocalcemia y anestro posparto (Kesler y Garverick, 1982; Bosu y Peter, 1987; Nakao y Grunert, 1990; Garverick, 1997; Cattaneo y col., 2014), y por último el estrés, el que ha sido postulado como uno de los factores predisponentes más importantes de la EQO (Vanholder y col., 2006; Amweg y col., 2016).

1.2.3. Disfunción hipotálamo-hipofisaria

En esta hipótesis, la causa principal de la formación de quistes estaría relacionada con una liberación aberrante de LH desde la hipófisis, ya sea porque el pico preovulatorio de LH está ausente o la magnitud es insuficiente u ocurre en un momento inadecuado durante la maduración del folículo dominante (Hamilton y col., 1995; Vanholder y col., 2006).

La falla en la liberación de LH parece ser causada por una alteración en el mecanismo de retroalimentación positiva de los estrógenos secretados por el folículo preovulatorio, lo cual resultaría en una falla en la liberación de GnRH y por ende de su acción a nivel hipofisario (Vanholder y col., 2006). Las vacas con EQO y con niveles elevados de estrógenos endógenos fallan en generar un pico de LH en respuesta a una dosis de E₂ exógeno, indicando que se ha perdido la capacidad de responder a la retroalimentación positiva de los E₂ sobre el eje hipotálamo-hipofisario (Zaied y col., 1981; De Silva y Reeves, 1988; Refsal y col., 1988). En este sentido, si la onda preovulatoria de GnRH/LH ocurre inoportunamente durante el crecimiento folicular, puede ocasionar la pérdida de sensibilidad del hipotálamo al efecto de retroalimentación positiva del E₂, conduciendo a la anovulación y consecuente formación de quistes (Gümen y col., 2002a; Gümen y Wiltbank, 2002). En un estudio realizado por Hamilton y col. (1995) se detectaron mayores concentraciones sistémicas

tanto de LH como de E₂ en vacas con quistes, a comparación de vacas con ciclos normales o con recuperación espontánea, sin registrarse el pico preovulatorio de LH en las hembras con EQO. El aumento en la secreción de LH en las hembras bovinas con quistes podría estimular un incremento en el E₂ que podría causar un aumento en la secreción de LH, desencadenando un efecto cascada que afectaría la respuesta ovárica a la secreción de LH. Resumiendo, la falta de sensibilidad a la retroalimentación positiva del estradiol a nivel del hipotálamo, desencadenaría la ausencia del pico preovulatorio de LH debido al menor contenido de GnRH en el área preóptica-supraquiasmática y a los mayores niveles de la misma en el tallo hipofisario-eminencia media desde donde se libera LH de manera tónica. Como consecuencia, los niveles basales de LH durante la fase de crecimiento folicular serían mayores (mayor frecuencia como resultado de un mayor contenido de GnRH en la eminencia media) y al momento de la ovulación, no habría niveles suficientes de GnRH en el centro cíclico (área preóptica-supraquiasmática) para inducir el pico preovulatorio de LH desde la hipófisis, conduciendo de esta manera a la formación de quistes. Por otra parte, los niveles basales persistentemente elevados de LH podrían actuar sobre los receptores de las células de la granulosa, estimulando el desarrollo folicular más allá del tamaño ovulatorio (Vanholder y col., 2006; Salvetti y col., 2007a). Con respecto al rol de los niveles de P₄ en la formación de los quistes, Hatler y col. (2003) encontraron que el 66 % de las vacas con quistes foliculares tenían concentraciones plasmáticas intermedias de P₄ (0,1-0,93 ng/ml) al momento de la detección del quiste. En otro estudio, Vanholder y col. (2005a) evidenciaron que al momento de la formación del quiste, solamente un 25 % fueron asociados con niveles intermedios de P₄ (0,3-2 ng/ml), siendo estas concentraciones capaces de bloquear el pico preovulatorio de LH y la ovulación. Un estudio más reciente, realizado por Probo y col. (2011), encontró que las concentraciones en todos los animales con EQO evaluados se mantenía en niveles intermedios de P₄ (0,3 a 1,2 ng/ml). Precisamente, el efecto de estas concentraciones intermedias de P₄ (por encima de los niveles basales pero no lo suficiente como para inducir la regresión de folículo dominante y el inicio de una nueva onda) sería inhibir la ovulación, bloqueando el pico de LH y aumentando su frecuencia pulsátil de esta gonadotrofina. Sin embargo, esta hipersecreción basal de LH no se asociaría a las causas de formación de los quistes sino a su crecimiento y persistencia a lo largo del tiempo. En este sentido, algunos autores

definen a la persistencia como una etapa en el desarrollo de los quistes (Cook y col., 1990; Hamilton y col., 1995; Ortega y col., 2015).

1.2.4. Disfunción ovárica-folicular

Una disfunción primaria a nivel folicular puede provocar una disrupción del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y causar la formación del quiste (Vanholder y col., 2006) De este modo, variaciones en la expresión y en el número de receptores de hormonas hipotálamo-hipofisarias así como de hormonas esteroides parecen estar implicados en la anovulación del folículo dominante. En este sentido, se ha sugerido que alteraciones en la expresión de receptores de gonadotrofinas podrían ser un factor relevante en el desarrollo de los quistes (Kawate y col., 1990; Calder y col., 2001; Wiltbank y col., 2002) De acuerdo con Kawate y col. (1990), el número de receptores de FSH y LH en las células de la granulosa de los quistes se redujo en comparación con los folículos normales.

Marelli y col. (2014) estudiaron la expresión del ARNm de los receptores de gonadotrofinas, LHCGR (receptor de hormona luteinizante/coriogonadotrofina) y FSHR por PCR en tiempo real. Ellos encontraron que la expresión de los transcritos para LHCGR y FSHR en las células de la granulosa de quistes fue significativamente más baja que aquella encontrada en todos los estadios de desarrollo folicular en los controles. En contraste, los niveles de expresión en células de la teca de quistes fueron menores que los encontrados en folículos antrales grandes. De la misma forma, ha sido demostrado previamente que un sutil desbalance en la expresión de los receptores de estrógenos (ESR) en los componentes del folículo ovárico podría también estar involucrado en la patogénesis de la formación de quistes en vacas (Garverick, 1997; Salvetti y col., 2007b, 2012; Alfaro y col., 2012), oveja (Ortega y col., 2009), humanos (Shushan y col., 1996; Jakimiuk y col., 2002) y roedores (Salvetti y col., 2009). Además, estudios realizados en vacas con EQO inducida con ACTH (Adrenocorticotrofina) mostraron cambios en la expresión del receptor de estrógenos-2 (ESR-2) en los folículos quísticos, y no así en los folículos controles, lo que prácticamente coincide con los hallazgos realizados en animales con EQO espontánea. En este último grupo también fue hallado un incremento en la expresión de ESR-1 (Salvetti y col., 2007a, 2012; Alfaro y col., 2012; Ortega y col., 2015). Estos pequeños cambios en los niveles de expresión de ESR-1 y ESR-2 podrían

alterar el desarrollo folicular y la ovulación (Mosselman y col., 1996; Pettersson, 1997), al modificar la proliferación y apoptosis celular, la expresión de receptores hormonales, la esteroidogénesis y todos los aspectos moleculares de la EQO (Isobe y Yoshimura, 2007; Salvetti y col., 2010; Velázquez y col., 2011, 2013; Ortega y col., 2015).

En vías de dilucidar el mecanismo de formación de los quistes, diversos estudios se han enfocado en la acción del estrés a nivel ovárico y ha sido propuesto que la acción de los glucocorticoides sobre la función ovárica podría ser antagónica a la función reproductiva (Acosta y col., 2005) y contribuiría a la formación de quistes (Baravalle y col., 2007), ejerciendo un efecto directo sobre las células de la granulosa, reduciendo la producción de esteroides gonadales, prostaglandinas y la expresión de receptores de LH (Kawate y col., 1990; Kol y col., 1998). Asimismo se cree que el cortisol producido en condiciones de estrés podría ser almacenado en el líquido folicular e inducir cambios notables en la esteroidogénesis y expresión de LHR a nivel de la pared folicular, contribuyendo al desarrollo de EQO (Moberg, 1991). De la misma forma y considerando que la ovulación es un evento inflamatorio caracterizado por un incremento en la síntesis de interleuquinas y prostaglandinas (Espey, 1980; Ando y col., 1998), un incremento en la producción de glucocorticoides antiinflamatorios durante la ovulación en respuesta a situaciones de estrés, podría limitar este proceso inflamatorio en el ovario (Hillier y Tetsuka, 1998; Michael y col., 2003; Acosta y col., 2005). Aunque el ovario no sería capaz de sintetizar *de novo* glucocorticoides, un estímulo con ACTH es capaz de estimular la secreción de cortisol de cultivos celulares de pared folicular (Wiltbank y col., 2002; Amweg y col., 2011; Amweg y col., 2013).

Además, el acceso de cortisol activo en los tejidos diana es regulado por la expresión relativa de las enzimas 11 β -hidroxiesteroide-dehidrogenasa 1 y 2 (11 β -HSD-1 y -2), que respectivamente catalizan la activación e inactivación del cortisol en el ovario bovino. Amweg y col. (2011, 2013) evidenciaron que los folículos ováricos podrían estar expuestos a altas concentraciones activas de glucocorticoides, ejerciendo así un rol local en la etiopatogenia de la EQO.

Otros componentes importantes en el control de la actividad ovárica son los miembros de la superfamilia del TGF- β , que actúan como moléculas regulatorias intraováricas involucradas en la proliferación y diferenciación celular, esteroidogénesis, maduración ovocitaria y función del cuerpo lúteo. Stangaferro y col. (2014) y Matiller y col. (2014) determinaron que alteraciones en los sistemas activina-inhibina-

foliculostatina y del TGF- β podrían conducir alterar la función folicular, favoreciendo la persistencia folicular y la formación de quistes.

Las bajas concentraciones de insulina y la falta de respuesta a LH han sido reportadas en vacas anéstricas posparto (Sinclair y col., 2002; Lucy, 2007). Hein y col. (2015) observaron una disminución en la expresión génica y proteica de algunos efectores de insulina corriente abajo en la vía de señalización, esto podría influir negativamente en la funcionalidad de los ovarios y contribuir a la persistencia del folículo y formación del quiste (Figura 6).

Otra hormona que podría estar implicada en la patogénesis de la EQO es la adiponectina (producida por los adipocitos). Existen estudios en mujeres que relacionan la adiponectina en el PCOS (Síndrome del Ovario Poliquístico) (Panidis y col., 2003; Escobar-Morreale, 2006; Aroda y col., 2008; Michalakis y Segars, 2010;), así como también en la reprogramación ovárica en ovinos (Ortega y col., 2010).

Como hemos descripto, en el ovario actúan diversos factores locales y sistémicos, cuyo desbalance o desregulación pueden provocar patologías a nivel reproductivo. Como factores que actúan a nivel local, la adiponectina, insulina y los miembros de la cascada de señalización de insulina, implicados en el crecimiento folicular y su progresión a estadios preovulatorios, podrían participar en el desarrollo de la EQO.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Una alteración en los mecanismos que involucran a sensores del estado metabólico, podría afectar el restablecimiento de la actividad ovárica favoreciendo el desarrollo de EQO.

2.2. Objetivo general

Estudiar desde una perspectiva molecular mecanismos que involucran sensores nutricionales claves y su posible participación en el desarrollo de la Enfermedad Quística Ovárica (EQO).

2.3. Objetivos específicos

1. Identificar y caracterizar casos de EQO en vacas de alta producción teniendo en cuenta variables tales como el balance energético, nutrición, condición corporal y producción láctea.
2. Cuantificar los niveles plasmáticos e intrafoliculares de ácidos grasos no esterificados (AGNE), β -hidroxibutirato (BHB), triglicéridos, colesterol y glucosa como parámetros metabólicos a tener en cuenta en vacas en posparto temprano, evaluando posibles vías implicadas en la metabolización lipídica.
3. Cuantificar los niveles séricos e intrafoliculares de progesterona, 17β -estradiol e insulina, como posibles indicadores tempranos de disfunción ovárica.
4. Detectar y cuantificar proteínas relacionadas con la transducción de las señales en respuesta a la insulina en células foliculares de ovarios provenientes de vacas controles y de animales con EQO para identificar posibles modificaciones asociadas a alteraciones en la dinámica folicular.
5. Detectar y cuantificar proteínas relacionadas con la transducción de las señales en respuesta a la insulina en células foliculares ováricas en un modelo de persistencia folicular, previamente desarrollado.

3. CAPÍTULO I:

***Alteración en las vías de
señalización de insulina y
su efecto sobre la
esteroidogénesis en vacas
con EQO***

3.1. CAPÍTULO I:

Introducción

3.1.1. Insulina: conceptos generales

La insulina es una hormona peptídica producida en las células β de los islotes de pancreáticos, que cumple un rol fundamental en la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Figura 6). Tiene un peso molecular cercano a los 6 kDa y está compuesta por dos cadenas conectadas entre sí mediante puentes disulfuro (Engelhardt y Breves, 2005). Es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso como *pre-pro-insulina* (peso molecular relativo 11,5 kDa). Tras escindirse la secuencia *pre* de la molécula, el péptido restante se denomina *pro-insulina*. La *pro-insulina* es homóloga a IGF1 e IGF2 y puede unirse al receptor de insulina con aproximadamente el 10 % de la afinidad de la insulina. La insulina es generada luego de que el péptido C se escinde de la *pro-insulina* mediante endopeptidasas activas en el aparato de Golgi y en gránulos secretorios inmaduros. La molécula de insulina resultante consiste en una cadena A (21 aminoácidos) y una cadena B (30 aminoácidos), con tres puentes disulfuro que las mantienen unidas: dos entre las cadenas A y B, y uno en la propia cadena A (Poretsky y col., 1999) (Figura 7).

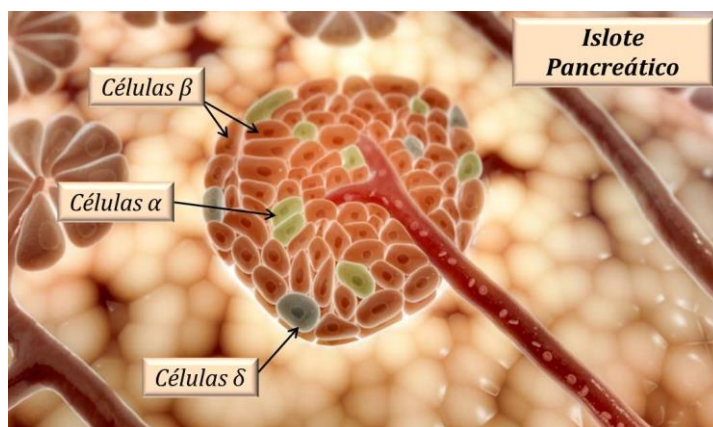


Figura 6: Esquema de un islote pancreático. Fuente: <https://www.polygonmedical.com/isletsoflangerhans>

La secreción hacia el espacio extracelular se realiza por exocitosis, desencadenada por estímulos específicos. Al llegar a la sangre, los hexámeros de insulina se disocian a monómeros. La hormona tiene una vida media corta (de 4 a 10 minutos) y es degradada por la insulinasa en el hígado (principalmente), riñón y otros tejidos

(Blanco, 2006). La liberación de insulina es un evento estrechamente relacionado a la síntesis de la misma. Existen diversos factores que estimulan la secreción tales como nutrientes (glucosa, galactosa, manosa, gliceraldehídos, arginina, etc.), hormonas gastrointestinales, estímulos parasimpáticos, etc. Los factores que suprimen la liberación de insulina incluyen condiciones fisiológicas, hormonas gastrointestinales, estimulación simpática y estrés (Hayirli, 2006).

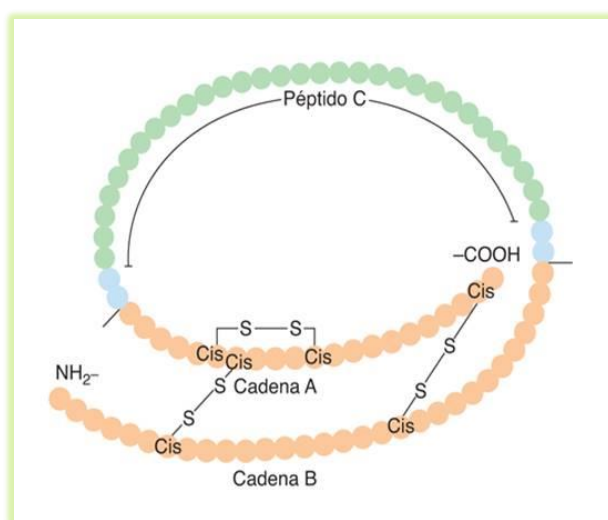


Figura 7: Esquema de la *pro-insulina*. Adaptado de Hammer y McPhee, 2015.

3.1.1.1. Vías de señalización de la insulina

La señalización de la insulina está mediada por una red compleja y altamente integrada que controla varios procesos. La estimulación del receptor de insulina (IR) conduce a la activación de *dos vías principales de señalización*: vía de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) que es responsable de la mayoría de las acciones metabólicas de la insulina, y vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), que regula la expresión de algunos genes y coopera con la vía PI3K para controlar el crecimiento y la diferenciación celular.

Entre los cientos de moléculas que participan en la vía de señalización de la insulina, se han identificado IRS (sustrato del receptor de insulina), PI3K y Akt (también conocida como proteína quinasa B (PKB)) como los *tres nodos críticos*. Estos

intermediarios se encuentran altamente regulados, median la interacción con otras cascadas de señalización y son esenciales para que la insulina ejerza su acción (Taniguchi y col., 2006).

3.1.1.1.1. Vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt

El IR es una glicoproteína integral de membrana, de aproximadamente 400 kDa. Es un heterotetrámero con dos subunidades α y dos subunidades β , todas ellas glicosiladas y unidas entre sí por puentes disulfuro. Las subunidades α se encuentran en el lado externo de la membrana; a ellas se une la insulina (Youngren, 2007). Tras la unión del ligando, el IR experimenta cambios conformacionales que permiten la autofosforilación de residuos de tirosina localizados en las subunidades β , intracelulares (Figura 8). Los residuos de tirosina sirven como sitios de acoplamiento para diversos sustratos celulares. En los mamíferos, se han identificado al menos 11 sustratos de IR. Estos incluyen la familia de proteínas IRS y el Shc (Src homology collagen). Se han detectado cuatro IRS diferentes en varios mamíferos (IRS-1 a IRS-4) y dos IRS adicionales en humanos (IRS-5 e IRS-6) (Dupont y Scaramuzzi, 2016). En los mamíferos, los IRS-1 e IRS-2 tienen funciones complementarias en la señalización y el metabolismo de la insulina. En contraste, el Shc no parece estar directamente involucrado en la señalización metabólica de la insulina, aunque es crítico en la mitogénesis inducida por esta hormona (Dupont y Scaramuzzi, 2016). Las proteínas IRS contienen un dominio amino-terminal de homología a pleckstrina (dominio PH) altamente conservado, seguido por un dominio de unión a fosfotirosinas (PTB), que en conjunto permiten el acoplamiento de IRS al IR activo. Los dominios PTB de los IRS 1 y 2 comparten el 75 % de homología en sus secuencias, mientras que la región carboxilo-terminal está pobremente conservada y contiene múltiples sitios de fosforilación de tirosinas que sirven como sitios de unión a dominios del tipo Sh2 (de homología al dominio 2 de la proteína Src), como los presentes en la subunidad reguladora de la PI3K (Belfiore y col., 2009).

Por otro lado, la fosforilación en serina de IRS1 es un mecanismo clave de retroalimentación negativa utilizado por la insulina en condiciones fisiológicas para

terminar su acción (Gual y col., 2005). En mujeres PCOS se ha asociado el estado de resistencia a la insulina con un aumento en la fosforilación de serinas (Dunaif, 1997).

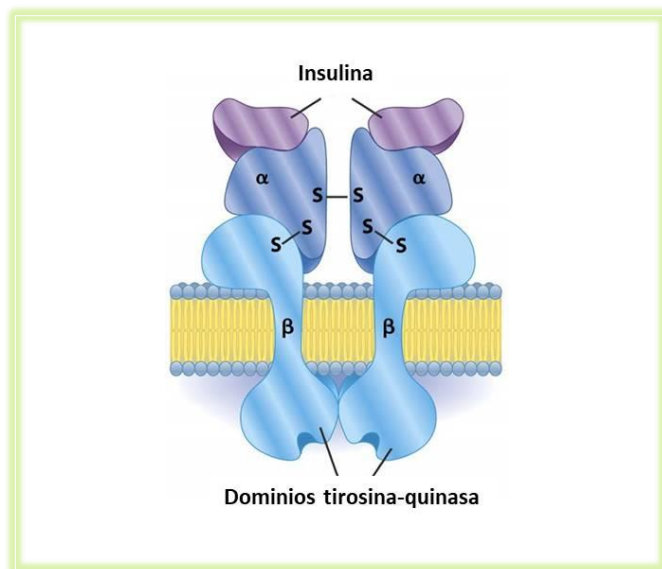


Figura 8: Esquema del receptor de insulina. Adaptado de Grover N, 2006.

La **PI3K** de mamíferos es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica de 110 kDa (p110) y una subunidad reguladora que contiene un dominio SH2 de aproximadamente 85 kDa (p85), y los dos están asociados de forma no covalente. Los inhibidores de PI3K bloquean prácticamente todas las acciones metabólicas de la insulina, incluida la estimulación del transporte de glucosa, la síntesis de glucógeno, la síntesis de lípidos y la diferenciación de adipocitos, lo que destaca el papel fundamental de PI3K en las acciones metabólicas de la insulina (Taniguchi y col., 2006). Una vez acoplado al IRS, PI3K fosforila el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2), produciendo fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que a su vez actúa como un segundo mensajero para activar la quinasa dependiente de fosfoinositol 1 (PDK1). La PDK1 activada es capaz de fosforilar Akt.

La **Akt** es una serina-treonina quinasa que participa cascada abajo en la señalización de PI3K. La Akt comprende tres isoformas, y es un punto de ramificación clave (nodo crítico, como se menciona previamente) para la señalización de la insulina (Dupont y Scaramuzzi, 2016). La Akt participa en la mayoría de las acciones metabólicas mediadas por PI3K a través de la fosforilación de varios sustratos que incluyen otras

quinasas, proteínas de señalización y factores de transcripción (Taniguchi y col., 2006; Youngren, 2007; Godslan, 2010; Dupont y col., 2012):

- Fosforilación e inactivación de TSC2 (complejo de esclerosis tuberosa 2), esta fosforilación activa el complejo mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero) involucrado en la síntesis proteica.
- Fosforilación e inhibición de la GSK3 (glucógeno sintasa quinasa 3), esto conduce a la desfosforilación y activación de la glucógeno sintasa y, por lo tanto, a una aceleración de la síntesis de glucógeno.
- Fosforilación e inhibición de Bad (promotor de muerte celular programada asociado a Bcl-2). Esta inactivación le confiere a Akt efectos antiapoptóticos.
- Fosforilación de FOXO1 (factor de transcripción de forkhead tipo 1). La fosforilación de los FOXO por Akt en respuesta a los factores de crecimiento conduce a la exclusión de los FOXO del núcleo, regulando sus acciones (Dupont y col., 2012).

La mTOR es una proteína quinasa altamente conservada que se encuentra en dos complejos de proteína estructural y funcionalmente distintos: complejo mTOR 1 (mTORC1) y complejo mTOR 2 (mTORC2). En el primero, mTOR se asocia con Raptor (proteína asociada reguladora de mTOR) y es un modulador clave del crecimiento celular, la proliferación celular y la traducción de ARNm. En el segundo, mTOR se asocia con Rictor (insensible a la rapamicina de mTOR) y promueve la reorganización de la actina presente en el citoesqueleto, la supervivencia celular y la progresión del ciclo celular (Dupont y Scaramuzzi, 2016) (Figura 9). Akt activa el complejo mTOR mediante la fosforilación e inactivación de TSC2, que es un inhibidor de mTOR, y además fosforila mTORC1 directamente, aunque esta conexión se encuentra poco estudiada (Guertin y Sabatini, 2007).

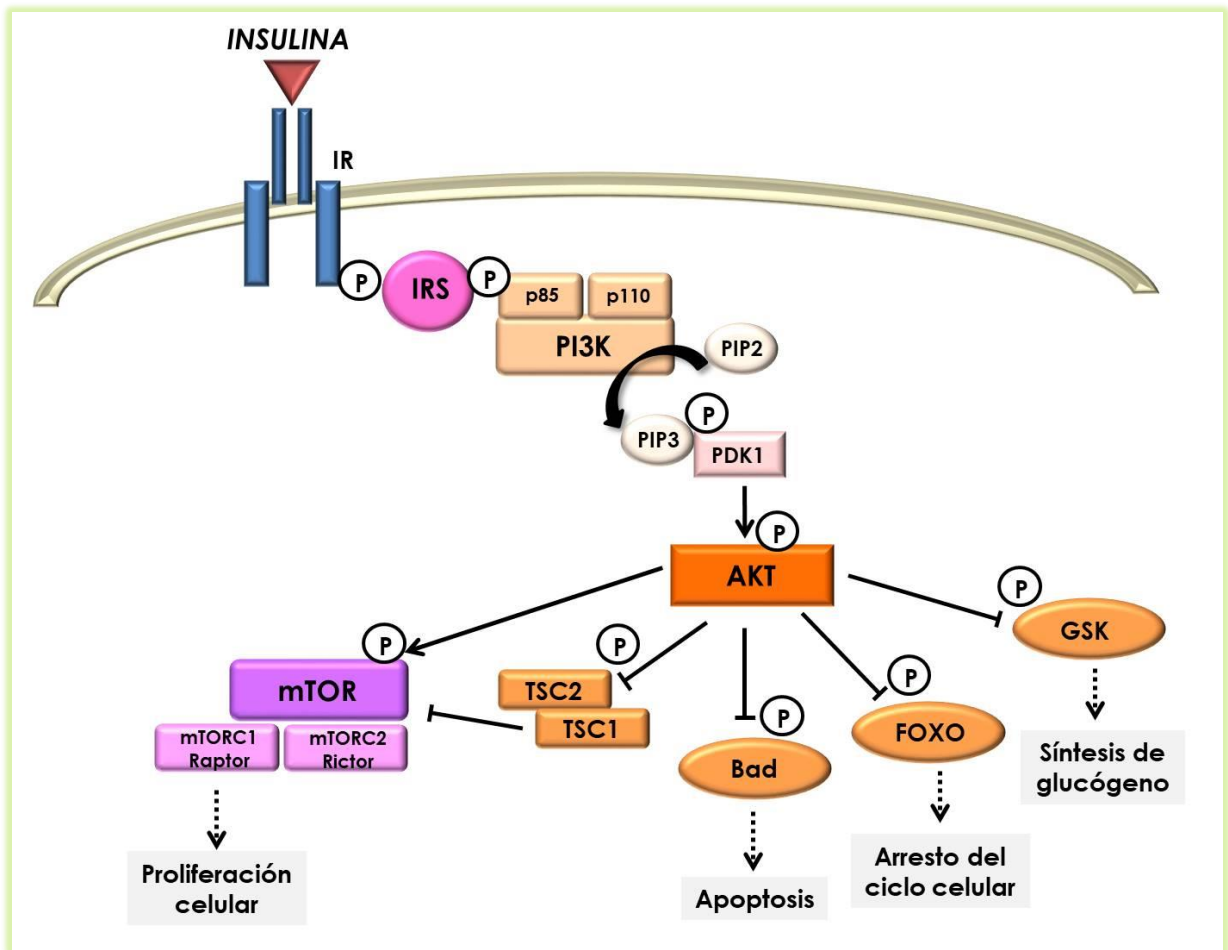


Figura 9: Vía de señalización PI3K/Akt activada por el receptor de insulina. Las influencias positivas se muestran mediante líneas que terminan en flechas y las influencias inhibitorias mediante líneas que terminan en barras. Adaptado de Godsland, 2010; Dupont y Scaramuzzi, 2016.

3.1.1.1.2. Vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK)

La otra vía de señalización constituida por la proteína quinasa activada por mitógeno, regula la expresión de ciertos genes que cooperan con la vía PI3K para el control del crecimiento y diferenciación celular. Esta segunda vía de señalización comienza por la unión de las proteínas Shc y el IRS al receptor de insulina, a estos se une el adaptador Grb2 que acopla el complejo Ras/mSOS. Ras es una proteína de unión a GTP que es activa cuando está unida a GTP y es inactiva cuando se asocia a GDP, es activada al unirse a mSOS. Luego de la activación, Ras recluta y activa la serina/treonina quinasa, Raf, que fosforila la quinasa MEK que, a su vez, fosforila y activa ERK1/2. Las ERK1/2 inactivas están localizadas principalmente en el citoplasma donde forman un

heterodímero MEK/ERK. Luego de la activación, ERK1/2 se traslocan al núcleo donde fosforilan sustratos involucrados en la activación de la transcripción de importantes genes (Belfiore y col., 2009). ERK1 y ERK2 estarían involucradas en las funciones de crecimiento y diferenciación de la insulina, y no en sus efectos metabólicos (Taniguchi y col., 2006) (Figura 10).

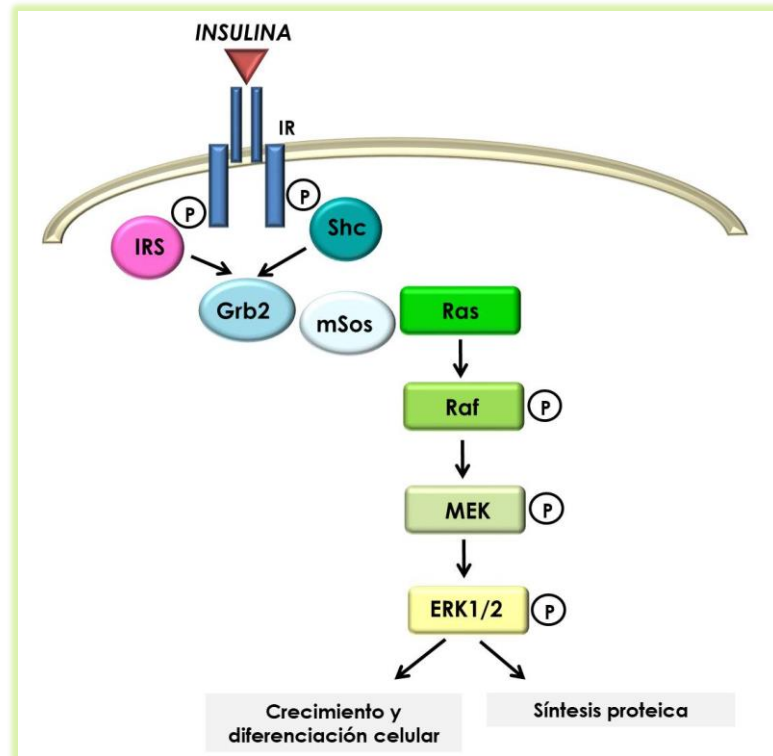


Figura 10: Vía de señalización de la MAPK, activada por el receptor de insulina. Adaptado de Dupont y Scaramuzzi, 2016.

3.1.1.2. Efectos generales de la insulina

La insulina cumple un rol esencial en el desarrollo y crecimiento normal del organismo, su principal función es mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal para cada especie, favoreciendo la captación y almacenamiento de este nutriente en músculo, tejido adiposo e hígado, de acuerdo a la disponibilidad energética del organismo. Además, regula el metabolismo de otros carbohidratos, lípidos y proteínas, y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos (Olivares Reyes y Arellano Plancarte, 2008).

Los efectos de la insulina abarcan diversas vías metabólicas, y regulan el estado fisiológico del animal: regulando los sistemas de transporte de membrana, la síntesis de ARN y proteínas, y la modulación de la actividad enzimática. Los principales órganos blanco de la insulina son: hígado, tejido adiposo y músculo esquelético.

Entre los efectos más importantes se destacan:

- *Efectos sobre el transporte de metabolitos:* estimula el ingreso de glucosa, aminoácidos, nucleósidos y fosfatos en las células de diversos tejidos del organismo (principalmente muscular y hepático). El incremento de glucosa estimula la secreción de insulina del páncreas. A través de la vía IRS-PI3K, la insulina secretada promueve el inmediato traslado del transportador de glucosa dependiente de insulina (GLUT) desde el interior de la célula hacia la membrana plasmática.
- *Efectos sobre el metabolismo de carbohidratos:* la insulina es la principal hormona hipoglucemiante. Es capaz de estimular la captación de glucosa en los tejidos con transportadores sensibles a la hormona y de promover su utilización.
- *Efectos sobre el metabolismo de lípidos:* estimula la síntesis *de novo* de ácidos grasos y triglicéridos en hígado, tejido adiposo, glándula mamaria y otros tejidos.
- *Efectos sobre el metabolismo de proteínas:* la insulina estimula la captación de aminoácidos por las células y su incorporación a proteínas, y activa los procesos de transcripción y traducción (Blanco, 2006).

3.1.1.3. Insulina en rumiantes

Existen varias diferencias a nivel metabólico entre rumiantes y no-rumiantes, entre ellos, el prácticamente continuo pasaje, absorción y metabolismo de nutrientes en los rumiantes. El rumen permite el paso de alimentos a medida que el tamaño de los mismos disminuye, esto hace que las concentraciones en sangre de los metabolitos absorbidos no varíen de manera abrupta.

Como resultado de la actividad microbiana ruminal, la mayor parte de los carbohidratos de la dieta se fermentan a ácidos grasos volátiles (AGV). Debido a esto, la cantidad de glucosa que llega al intestino para su absorción es mínima, por lo que el rumiante debe satisfacer sus necesidades generando glucosa a partir de otras fuentes mediante gluconeogénesis (Bergman, 1976; Qaid y Abdelrahman, 2016). Los principales

precursores para éste proceso son propionato, lactato, piruvato, aminoácidos y glicerol (Bergman, 1976). Cuando el suministro de glucosa es limitado y la tasa de gluconeogénesis no alcanza a cubrir los requerimientos, se necesitan fuentes alternativas de energía; por lo que se movilizan las reservas corporales (Brockman y Laarveld, 1986).

Ciertos órganos como la glándula mamaria y el útero captan glucosa desde el plasma de manera independiente de la insulina, sin embargo, otros tejidos como el muscular y el adiposo dependen de esta hormona. El estado de anabolismo general que impone la insulina no siempre es el objetivo buscado en los rumiantes. En el caso de las vacas lecheras y debido a que la captación de glucosa en la glándula mamaria es independiente de insulina, un aumento de la glucemia y la consecuente liberación de insulina origina competidores para la glándula mamaria, lo que podría perjudicar la producción de lactosa, principal responsable del volumen de leche producido (Relling y Mattioli, 2002).

Las concentraciones bajas de insulina y la reducida capacidad de respuesta a la insulina son importantes adaptaciones endocrinas para la lactancia y la preñez. Esto promueve la producción de glucosa y reduce la absorción de nutrientes por los tejidos maternos, lo que los desvía a la glándula mamaria y al útero gestante. Estos órganos no responden a la insulina, por lo tanto, las bajas concentraciones de insulina aseguran que la lactancia y el crecimiento fetal puedan ocurrir a expensas de la ganancia materna. La hormona del crecimiento puede facilitar estos procesos al inducir la resistencia a la insulina (Brockman y Laarveld, 1986).

3.1.1.4. Rol de la insulina en el ovario

Se ha demostrado que el ovario es un sitio de acción para la insulina en varias especies, incluidas las vacas lecheras (Spicer y col., 1990; Spicer y Echternkamp, 1995; Webb y col., 2004; Webb y Campbell, 2007; Velazquez y col., 2008;). El ovario utiliza la glucosa como su principal fuente de energía (Rabiee y col., 1999; Scaramuzzi y col., 2010). Para que la glucosa pueda ser utilizada por las células es necesario que exista cantidad suficiente y además, que sea capaz de ingresar a las mismas, adquiriendo la insulina, un rol significativo (Wade y Schneider, 1992).

En la reproducción, la insulina desempeña una función más compleja que en el metabolismo de la glucosa, y está implicada en el desarrollo y la funcionalidad folicular (Veerkamp y col., 2003; Garnsworthy y col., 2008). La insulina y su correcta señalización son necesarias para una competencia reproductiva completa, sin embargo, por sí sola es insuficiente para restaurar la función reproductiva frente a desafíos metabólicos extremos, especialmente una marcada hipoglucemia (Krasnow y Steiner, 2006). De este modo, se sugiere que la insulina podría influir en la fertilidad a través de la partición del combustible metabólico, principalmente de glucosa, en lugar de hacerlo a través de efectos directos (Veerkamp y col., 2003). Actualmente, se cree que el folículo posee un sistema adecuadamente desarrollado para evaluar la concentración de glucosa y el estado nutricional (Webb y col., 2004; Garnsworthy y col., 2008; Scaramuzzi y col., 2010). Este sistema permite al folículo determinar su crecimiento y desarrollo, principalmente al modular los efectos inducidos por FSH en la síntesis local de 17β -estradiol, de acuerdo con la disponibilidad de glucosa (Webb y col., 2004; Scaramuzzi y col., 2010).

En vacas lecheras, las concentraciones bajas de insulina promueven la lipólisis del tejido adiposo y conducen al aumento de las concentraciones de AGNE, favoreciendo al desarrollo de enfermedades metabólicas como la cetosis y la lipidosis hepática (Roche, 2006; Bossaert y col., 2008). En ovario, los altos niveles de AGNE poseen un efecto perjudicial sobre la funcionalidad de las células de la granulosa (Vanholder y col., 2005b).

Los bajos niveles de insulina están asociados genotípica (Gutierrez y col., 2006) y fenotípicamente (Ingvarsen y Friggens, 2005) con una elevada producción de leche. Aunque la insulina no tiene efectos directos sobre la galactopoyesis, niveles bajos de insulina disminuyen la captación de glucosa por los tejidos sensibles a la misma (por ejemplo, músculo esquelético) y mejora la disponibilidad de glucosa para la glándula mamaria (Zhao y col., 1996; Nishimoto y col., 2006; van Knegsel y col., 2007). Por lo tanto, la insulina es una molécula candidata muy interesante sobre la paradoja entre la producción láctea, las enfermedades metabólicas y el rendimiento reproductivo (Bossaert y col., 2008).

La insulina actúa ejerciendo efectos directos e indirectos sobre la esteroidogénesis y el crecimiento de las células de la granulosa y de la teca. Esto ha sido demostrado tanto *in vitro* (Spicer y Echterkamp, 1995; Gutiérrez y col., 1997; Spicer y

col., 2002) como *in vivo* (Matamoros y col., 1990; Simpson y col., 1994; Bossaert y col., 2010). La insulina constituiría factor esencial para la maduración folicular (Landau y col., 2000) y la función ovárica normal en el posparto (Miyoshi y col., 2001), dado que incrementa la capacidad esteroidogénica del folículo dominante (Butler y col., 2004). Por otra parte, la insulina estimula la expresión del receptor de LH en las células de la granulosa, principalmente de manera indirecta, a través de la estimulación del receptor del IGFR1 (Davoren y col., 1986).

En vacas lecheras de alta producción, los bajos niveles plasmáticos de insulina estarían asociados con alteraciones del desarrollo folicular, como en la EQO (Vanholder y col., 2005b; Bossaert y col., 2008) y al alargamiento del intervalo parto-primera ovulación (Gong, 2002; Diskin y col., 2003; Butler, 2005), resultando en una reducción en la fertilidad. La importancia de los miembros de la cascada de señalización de la insulina en reproducción ha sido ampliamente estudiada. En trabajos realizados con ratones *knock out* se observó que la delección del IRS compromete la fertilidad en las hembras (Burks y col., 2000). De manera similar, la delección específica del PPAR γ (receptor nuclear activador de la proliferación peroxisomal gamma) en células de la granulosa perturba la ruptura folicular (Kim y col., 2008) causando esterilidad o fertilidad reducida (Cui y col., 2002). Ortega y col. (2010) demostraron que los miembros de la cascada de señalización de la insulina y las proteínas metabólicas relacionadas, se expresan en diferentes estadios del desarrollo folicular en ovarios ovinos, con niveles de expresión aumentados de PPAR γ en animales hiperandrogenizados durante el desarrollo fetal, sugiriendo un rol en las perturbaciones implicadas en reprogramación ovárica. Diversos estudios relacionaron los cambios en la concentración de insulina sistémica con las alteraciones en la secreción pulsátil de la LH (Downing y Scaramuzzi, 1997; Downing y col., 1999; Bucholtz y col., 2000; Tanaka y col., 2000). Más aún, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* la insulina estimula la liberación de GnRH, pero esto ocurre sólo cuando hay disponibilidad de glucosa (Arias y col., 1992; Tanaka y col., 2000).

3.1.2. Esteroidogénesis

Las hormonas esteroides tienen una estructura común derivada del colesterol de 17 carbonos dispuestos en cuatro anillos. Aunque los esteroides pueden sintetizarse *de*

novo en células con capacidad esteroidogénica a partir de acetato, la mayoría derivan del colesterol, que se sintetiza en los hepatocitos. A este grupo pertenecen los glucocorticoides, aldosterona, y andrógenos de la corteza suprarrenal, estrógenos, progesterona y testosterona gonadales y 1,25-dihidroxi-D₃, metabolito activo de la vitamina D₃ (Blanco, 2006).

Las hormonas esteroides sexuales se dividen en tres grandes grupos según su número de átomos de carbono: progestágenos (21 C), andrógenos (19 C) y estrógenos (18 C). En el ovario se sintetizan las tres clases de hormonas sexuales esteroides (Engelhardt y Breves, 2005). La esteroidogénesis en el ovario bovino se lleva cabo en las células de la granulosa y de la teca de los folículos y en el cuerpo lúteo. En estudios realizados para evaluar la esteroidogénesis durante el desarrollo de la primera onda folicular, se determinó que las células de la granulosa experimentan cambios secuenciales en su capacidad esteroidogénica a medida que surge y crece el folículo dominante.

El primer paso en la esteroidogénesis es la conversión de colesterol a pregnenolona. Para ello, ocurren reacciones secuenciales catalizadas por la enzima P450_{scc} (del inglés: *cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage*) que hidroxila las posiciones 20 y 22, y escinde la cadena lateral de la molécula de colesterol. Dichas reacciones se llevan a cabo tanto en las células de la granulosa como de la teca (Conley y Bird, 1997; Fortune, 1986; Sahmi y col., 2004). Este paso se realiza en las mitocondrias, es regulado hormonalmente, y es limitante en la síntesis de todas las hormonas esteroides. Asimismo, el metabolismo de la pregnenolona es determinante para la función de la corteza suprarrenal en los mamíferos. En la síntesis de esteroides, se reconoció la existencia de rutas alternativas de utilización de la pregnenolona para la síntesis de andrógenos. Considerando el aislamiento de las moléculas predominantes, principalmente la 17 α -hidroxipregnenolona (17OH-P5) y dehidroepiandrosterona (DHEA) (metabolitos Δ 5) o 17 α -hidroxiprogesterona (17OH-P4) y la androstenediona (metabolitos Δ 4), se conocieron estas dos vías de la esteroidogénesis llamadas Δ 5-3-hidroxiesteroide y Δ 4-3-cetona.

En los rumiantes la esteroidogénesis ocurre primariamente a través de la vía Δ 5 (Conley y Bird, 1997; Sahmi y col., 2004). En esta vía la pregnenolona se metaboliza a DHEA mediante la acción de la enzima citocromo P450 17 α -hidroxilasa (CYP17A1, presente en células de la teca) por hidroxilación y escisión. Luego se

metaboliza a androstenediona por acción de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) por dehidrogenación e isomerización. Dichas enzimas se encuentran asociadas al retículo endoplasmático liso de las células. La androstenediona ingresa a las células de la granulosa y se convierte en estrona por acción de la enzima citocromo P450 aromatasa (CYP19A1) (Simpson y Davis, 2001; Sahmi y col., 2004)

que luego se convierte en 17β -estradiol por acción de la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) (Luu-The, 2001; Sahmi y col., 2004) (Figura 11). La transcripción de la CYP19A1 está regulada por varios sitios promotores que responden a citoquinas, nucleótidos cíclicos, gonadotrofinas, glucocorticoides y factores de crecimiento (Stocco, 2008).

Debido a que las células de la granulosa carecen de expresión de la CYP17A1, la pregnenolona puede convertirse en progesterona mediante la 3β -HSD (Conley y Bird, 1997). Los folículos en menor estadio de desarrollo contienen bajas concentraciones de 17β -estradiol y escasa o nula cantidad de CYP19A1 (Bao y col., 1997). A medida que los folículos avanzan en la etapa de selección, se detecta un marcado incremento en el contenido de 17β -estradiol (Mihm y col., 2000; Fortune y col., 2004) y de la expresión de ARNm codificante para la CYP19A1 (Bao y col., 1997; Sahmi y col., 2004; Webb y Campbell, 2007). Los folículos dominantes secretan más 17β -estradiol que los subordinados (Mihm y col., 2000; Fortune y col., 2001) y expresan mayores niveles de ARNm para CYP19A1 (Evans y Fortune, 1997; Sahmi y col., 2004). Del mismo modo, la abundancia de ARNm codificante del complejo P450scc aumenta en las células de la granulosa de los folículos a medida que se vuelven dominantes, aunque estos cambios son menos marcados que los detectados para la CYP19A1 (Bao y col., 1997). La expresión de la 3β -HSD en células de la granulosa es más discutida, mientras que unos estudios detectaron ARNm por hibridación *in situ* sólo al inicio de la dominancia (Bao y col., 1997), otros autores no detectaron diferencias en la actividad (Carrière y col., 1996) ni en la expresión de ARNm evaluada por RT-PCR cuantitativa durante el desarrollo folicular (Beg y col., 2001).

En la actualidad se sabe que la proporción de esteroidogénesis en presencia del complejo P450scc está determinada por otra proteína, la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR, del inglés *Steroidogenesis Acute Regulatory Protein*). La StAR se ha identificado recientemente como una fosfoproteína mitocondrial que es rápidamente inducida por hormonas tróficas y está implicada en la movilización de

colesterol en desde la membrana mitocondrial externa hacia la interna, donde reside el complejo P450scc (Braw-Tal y Roth, 2005; Stocco y col., 2005). La alteración en cualquiera de los componentes de esta compleja cascada puede llevar a trastornos importantes en la fertilidad.

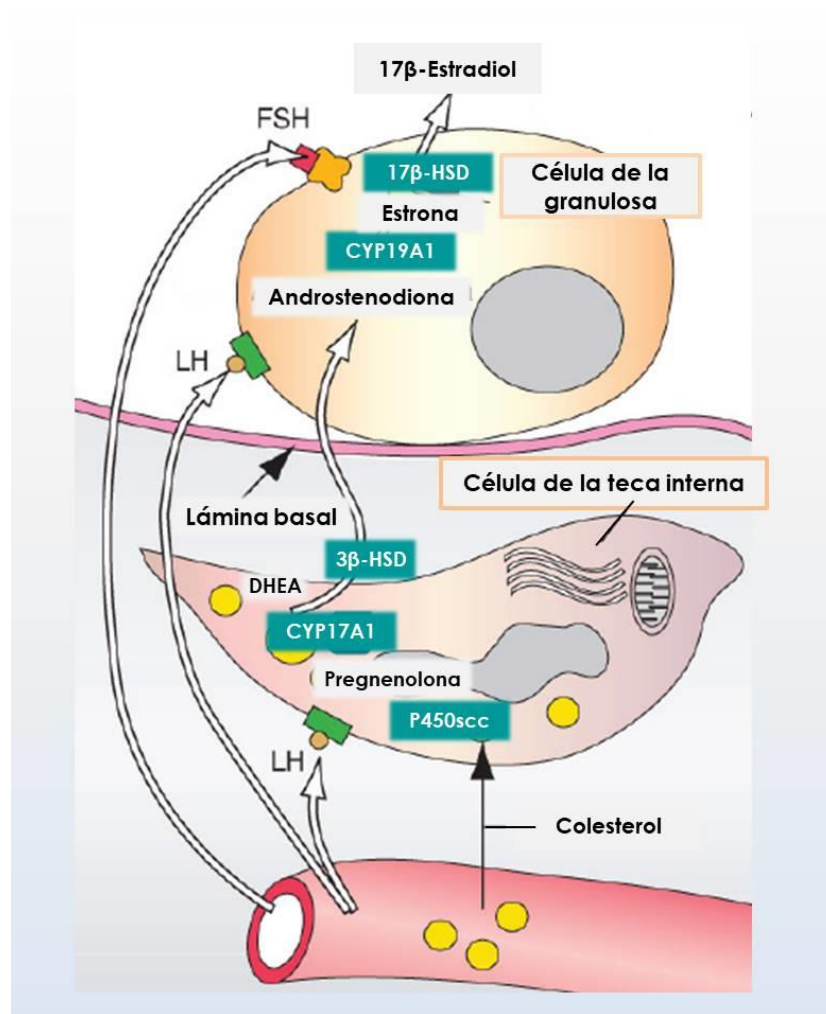


Figura 11: Esquema de esteroidogénesis en el ovario. Adaptado de Welsch Sobotta, 2008. Atlas de digital de histología. 2^{da} edición.

3.1.2.1. Regulación de la esteroidogénesis por las gonadotrofinas

El crecimiento folicular y la esteroidogénesis dependen de la acción coordinada de la FSH y LH con sus receptores presentes en las células de la granulosa y de la teca de los folículos ováricos. El modelo más aceptado para el crecimiento folicular y

esteroidogénesis sugiere que tanto las células de la granulosa como de la teca están involucradas en la síntesis de 17β -estradiol (Fortune y Quirk, 1988; Bao y Garverick, 1998). Dicho modelo se denomina modelo “dos células/dos gonadotrofinas” dado que intervienen tanto las células de la granulosa a través de la presencia de receptores para FSH y las células de la teca que expresan receptores para LH desde etapas tempranas del desarrollo folicular. Como se describe previamente, ambos tipos celulares contienen el complejo P450_{scc}, necesario para la síntesis de progestágenos. En las células de la teca, los progestágenos, pregnenolona o progesterona, son los precursores para la síntesis de androstenediona. La unión de LH a sus receptores en las células de la teca estimula la actividad de la enzima CYP17A1, la cual convierte los progestágenos en andrógenos.

La alta vascularización presente en la teca interna de los folículos antrales, permite una constante exposición a niveles sistémicos elevados de LDL-colesterol y, en consecuencia, proporciona una mayor disponibilidad del sustrato para la síntesis de progestágenos y andrógenos en todas las etapas del desarrollo folicular. Posteriormente, los andrógenos se metabolizan a estrógenos en las células de la granulosa por la CYP19A1, cuya expresión es inducida por la FSH en folículos preovulatorios, tal como se describió anteriormente. En etapas avanzadas del desarrollo folicular, las células de la granulosa expresan receptores para LH, lo cual podría estar asociado al mantenimiento de la dominancia (Bao y col., 1997). Si bien en la regulación del desarrollo folicular y la esteroidogénesis participan factores intraováricos, el efecto de las gonadotrofinas ejerce una fuerte influencia en estos procesos, siendo capaces de modular de este modo la funcionalidad folicular.

3.1.3. Efecto de la insulina sobre la esteroidogénesis

La insulina es fundamental para el desarrollo final y ovulación de los folículos (Gong, 2002; Kawashima y col., 2007) y en la regulación de la esteroidogénesis (Spicer y col., 2002; Silva y col., 2006). Diversos estudios *in vitro* han demostrado los efectos estimulantes de la insulina (dosis-dependiente) sobre la proliferación celular y la síntesis de esteroides en células de la granulosa y de la teca bovinas; a través de sus acciones directas sobre el folículo, así como por una mayor capacidad de respuesta local del folículo a la FSH y LH (Spicer y col., 1994; Stewart y col., 1995; Gutiérrez y col., 1997;

Dupont y col., 2014b). En el ovario, la insulina modula la respuesta de las células de la granulosa a las gonadotrofinas, principalmente a la LH (Willis y col., 1996; Shimizu y col., 2008) y se ha asociado con la esteroidogénesis (Spicer y Chamberlain, 1998; Spicer y col., 2002 Silva y col., 2006).

Diversos autores han demostrado que la insulina estimula la síntesis de estrógenos en células de la granulosa (Spicer y Echternkamp, 1995; Willis y col., 1996 Gutiérrez y col., 1997) y además aumenta la secreción de progesterona en células de la granulosa humanas y bovinas (Spicer 1993, Taketani 2008). Shimizu y col. (2008) determinaron mayores niveles de 17 β -estradiol en el líquido folicular de los folículos preovulatorios. Esta mayor producción de 17 β -estradiol podría asociarse con un aumento en la expresión de IR en los folículos preovulatorios, que sumado a los mayores niveles de insulina presentes (Landau y col., 2000), serían esenciales para conducir el desarrollo de folículos a la ovulación. Por otro lado, una baja tasa de concepción y reducidos niveles de progesterona en la fase folicular han sido asociados con niveles bajos de glucosa e insulina circulante en vacas de alto mérito genético (Pryce y col., 2001; Snijders y col., 2001; Veerkamp y col., 2003; Webb y col., 2004).

Pese a los antecedentes descriptos, los mecanismos reguladores implicados en el desarrollo folicular ovárico y la esteroidogénesis aún no se encuentran resueltos. Fukuda y col. (2009) mostraron que la LH estimula la expresión de ARNm de CYP17A1 y la producción de andrógenos en células de la teca bovina a través de la activación de la ruta fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K/Akt). Por otro lado, la FSH también puede activar la vía PI3K/Akt y se ha demostrado una interacción delicada entre AMPc/PKA (proteína quinasa A) y la señalización PI3K en la regulación de la esteroidogénesis por FSH y el TGF- β 1 en células de la granulosa en ratas (Chen y col., 2007).

Además, Silva y col. (Silva y col., 2006) observaron que a dosis fisiológicas, la FSH y la insulina estimulan el ARNm de CYP19A1 y la secreción de 17 β -estradiol predominantemente a través de la señalización de AMPc. En las células de teca bovina, se ha informado que una inhibición de la fosforilación de ERK aumenta la producción de progesterona y disminuye la producción de androstenediona de manera concomitante con una modulación de la expresión de StAR y CYP17A1 (Tajima y col., 2005). En líneas celulares de ratón, Duarte y col. (2014) demostraron que StAR, ERK y PKA son necesarios para la producción máxima de esteroides. Anteriormente hemos reportado

mecanismos de respuesta a la insulina que podrían interactuar en la fisiología ovárica en ovejas (Ortega y col., 2010) y en vacas con EQO (Hein y col., 2015).

3.1.4. Quistes ováricos

Diversos estudios sugieren que alteraciones en la cascada de señalización de la insulina, participan en disfunciones ováricas (Ledoux y col., 2006; Baba y col., 2007; Seto-Young y col., 2007; Yaba y col., 2008; Ortega y col., 2010; Hein y col., 2015). Existen puntos críticos de regulación relacionados con el rol de la insulina como mediadora de perturbaciones ováricas. Entre ellas se incluyen IR, IRS y PI3K, entre otros. Tanto insulina como IGF1 participan en el control del crecimiento y desarrollo folicular (Spicer y Echternkamp, 1995), ambos estimulan la expresión de LHR en las células de la granulosa (Davoren y col., 1986) y es sabido que la insulina es un potente estimulador de la esteroidogénesis (Armstrong y col., 2002; Silva y Price, 2002), por lo que, sus bajas concentraciones en el postparto temprano podría contribuir al proceso de anovulación y la concomitante formación de quistes (Zulu y col., 2002; Cattaneo y col., 2014; Hein y col., 2015). Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que la expresión de intermediarios en la primera fase de la vía PI3K de la respuesta a insulina se encuentra disminuida en estructuras foliculares de bovinos con EQO, pudiendo afectar mecanismos claves para la funcionalidad ovárica y favorecer el desarrollo de la enfermedad (Hein y col., 2015).

En base a esto, nos propusimos detectar y cuantificar proteínas relacionadas con la transducción de las señales en respuesta a la insulina en ovarios provenientes de vacas controles y con EQO para identificar posibles modificaciones asociadas a alteraciones en la dinámica folicular. Además, nos planteamos realizar la medición de los niveles séricos e intrafoliculares de hormonas esteroides e insulina, como posibles indicadores tempranos de disfunción ovárica.

3.2. CAPÍTULO I:

Materiales y métodos

3.2.1. Procedimientos generales efectuados con animales

Todos los procedimientos efectuados con animales fueron aprobados por el Comité de Ética y Seguridad Institucional de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) de Santa Fe (Protocolo N° 131/12), y se realizaron de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. 3° ed. Federation of Animal Science Societies, 2010).

3.2.1.1. Animales y grupos de estudio

En el presente capítulo haremos referencia a 3 grupos de animales: grupo control, grupo EQO y grupo proveniente de frigorífico. Este último incluye ovarios morfológicamente sanos y ovarios con presencia de una o más estructuras quísticas; como se describirá más adelante.

Para los grupos control y EQO se seleccionaron vacas multíparas (2 a 4 partos) de la raza Holando Argentino en lactancia. Se contó con el aval de los productores y médicos veterinarios de los establecimientos lecheros de procedencia, ubicados en la zona rural cercanos a la FCV-UNL. En todos los casos se realizó una anamnesis de los animales y el rodeo. Los animales tenían una producción de leche promedio de entre 22 y 26 litros por día y una condición corporal que se encontraba entre 2,75 y 3,50 puntos (Edmonson y col., 1989). La alimentación estuvo basada en pastura de alfalfa, silaje de maíz, alimento balanceado comercial, heno de alfalfa y agua *ad libitum*.

3.2.1.1.1. Grupo control

El grupo control fue constituido por vacas clínicamente sanas y sin alteraciones reproductivas, cuyos ciclos estrales fueron sincronizados previamente a la toma de muestras, de manera que al momento de la misma, se encontraran en proestro. Para ello, se aplicó el protocolo adaptado del denominado G6G seguido por Ovsynch (Bello y col., 2006; Díaz y col., 2015). El día 0 del protocolo estuvo determinado por el inicio de la sincronización del ciclo estral en todos los animales. El protocolo de sincronización

consistió en la aplicación de dos dosis de PGF2 α (150 μ g D + cloprostenol; Enzaprost DC, Biogénesis-Bagó, Garín, Buenos Aires, Argentina) separadas por 12 horas el día 0 para inducir la luteólisis (am-pm) (Hatler y col., 2008), seguido de una dosis de GnRH (20 μ g acetato de buserelina; Gonaxal, Biogénesis-Bagó, Argentina) dos días después para estimular la ovulación de los folículos dominantes presentes (día 2). Seis días posteriores a la primera dosis de GnRH, las vacas recibieron una segunda dosis de GnRH (día 8). Siete días más tarde, las hembras recibieron las dos últimas dosis de PGF2 α , separadas por 12 horas, para inducir la luteólisis (día 15). El día 18 del protocolo se realizó la ovariectomía o la aspiración del líquido folicular del folículo preovulatorio (según correspondiera) (Figuras 12 y 13). Se realizó la aspiración del líquido folicular del folículo preovulatorio a 15 vacas controles en total. Sólo cinco de estas vacas fueron ovariectomizadas.

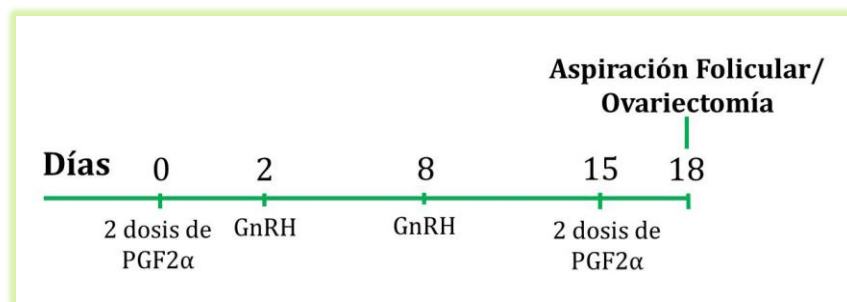


Figura 12: Protocolo de sincronización de celo utilizado en el grupo control. G6G-Ovsynch. Adaptado de Bello y col., 2006; Díaz y col., 2015.



Figura 13: imágenes ultrasonográficas de ovarios con un folículo preovulatorio.

3.2.1.1.2. Grupo EQO espontánea

Se realizó la identificación de casos de EQO espontánea a través de controles reproductivos de rutina en rodeos comerciales de la zona, mediante la cooperación de profesionales del área de influencia de la FCV-UNL. Los médicos veterinarios a cargo de estos rodeos informaron al primer indicio de alteraciones foliculares compatibles con EQO, las cuales fueron verificadas mediante palpación rectal y ultrasonografía (transductor lineal transrectal 5 MHz, Honda HS101V, Japón) (Figura 14) por nuestro grupo de trabajo, considerando las definiciones de EQO reportadas por Silvia y col. (2002) y Bartolomé y col. (2005). Se realizó la aspiración del líquido folicular a 25 vacas con EQO en total. Sólo diez de estas vacas fueron ovariectomizadas.



Figura 14: Imágenes ultrasonográficas de ovarios con presencia de quistes foliculares.

3.2.1.1.3. Grupo proveniente de frigorífico

Además de los grupos descriptos previamente, trabajamos sobre muestras de animales enviados a faena. En frigoríficos de la zona, se recolectaron ovarios macroscópicamente sanos y ovarios con estructuras foliculares compatibles con la definición de quistes previamente descripta (Silvia y col., 2002) (Figura 15). En ambos casos, los ovarios provenían de vacas de la raza Holando Argentino, en las que se verificó visualmente la ausencia de preñez y de alteraciones macroscópicas del sistema reproductivo.

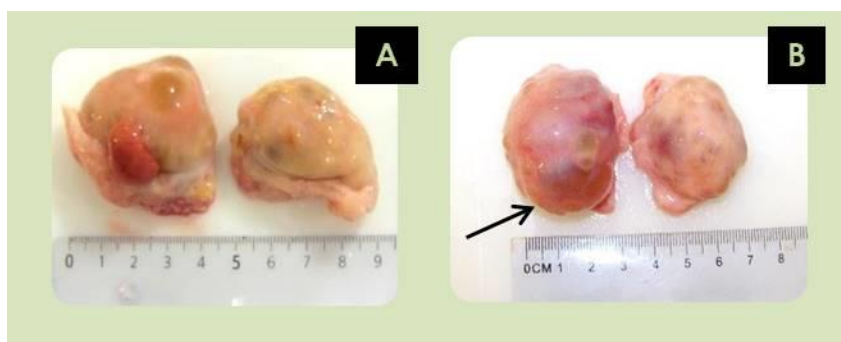


Figura 15: Pares de ovarios obtenidos de frigorífico. (A) Ovarios sanos (B) Ovarios de una vaca con EQO, la flecha indica el ovario con una estructura quística.

3.2.1.2. Seguimiento de los cambios ováricos mediante ultrasonografía

Se realizó la palpación rectal y ultrasonografía del tracto reproductivo en los animales, con el objetivo de lograr un seguimiento de los cambios ocurridos durante el ciclo estral (en las vacas control) y diagnosticar la enfermedad quística (en las vacas con posible EQO). Para ello se utilizó un equipo de ultrasonografía equipado con un transductor lineal transrectal de 5 MHz (Honda HS101V) (Figura 16). Los parámetros considerados normales para proestro fueron un diámetro medio de los folículos ovulatorios de 15-18 mm, ausencia de cuerpo lúteo y presencia de tono uterino, con una duración media del ciclo estral de 19-21 días. Para los casos de EQO se consideró un diámetro promedio de los folículos quísticos mayor a 20 mm, con una persistencia igual o superior a los 10 días con interrupción de los ciclos estrales normales y ausencia de tonicidad uterina, sin que se produzca la ovulación o la formación de un cuerpo lúteo (Silvia y col., 2002; Bartolome y col., 2005).



Figura 16: (A) Ecógrafo portátil (Honda HS101V). (B) Técnica de ultrasonografía transrectal.

3.2.1.3. Obtención de muestras: grupos control y EQO

A partir de la sincronización de las vacas del grupo control en proestro y del diagnóstico vacas con EQO, y dependiendo de la categoría de los animales, se tomaron dos tipos de muestras principales: ovarios completos (de vacas con indicación de rechazo por motivos no reproductivos) y/o líquido folicular (en vacas en lactancia sin indicación de rechazo). La obtención de ovarios completos se efectuó mediante ovariectomía bilateral, mientras que la extracción del líquido folicular se realizó por aspiración folicular guiada por ecografía, utilizando la técnica descrita por Seneda y col. (2003) como se detalla más adelante.

Además, en ambos casos, se tomaron muestras de sangre y se confeccionó una anamnesis completa del animal, recabando datos sobre la alimentación, niveles de producción, manejo e índices reproductivos, para un posterior análisis en trabajos paralelos dentro de nuestro grupo de investigación.

3.2.1.3.1. Obtención de sangre

En todos los casos se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante al momento de la ovariectomía y de la aspiración de líquido folicular para la determinación de

hormonas en suero. Se utilizó la técnica de extracción a través de punción de vasos coccígeos (Figura 17).



Figura 17: Técnica de extracción de sangre de vasos coccígeos.

3.2.1.3.2. Obtención de líquido folicular

Para la aspiración del líquido folicular se adaptó la técnica descrita por Seneda y col. (2003) que ha sido ampliamente utilizada en la obtención de muestras para estudios moleculares. Para tal fin, se utilizó un sistema de ultrasonido digital Chison 8300Vet equipado con un transductor microconvexo de 5,0 MHz montado en una sonda transvaginal para aspiración folicular (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil). La misma posee una guía para la colocación de una aguja calibre 20 G que se conecta por medio de una tubuladura de teflón a tubos contenedores cónicos estériles de 50 ml. Para la aspiración se empleó una bomba de vacío (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil) a una presión de aspiración de 500 mmHg. El dispositivo de aspiración fue introducido vía vaginal hasta contactar con el fondo de la vagina, y el ovario previamente localizado por tacto rectal, fue acercado al transductor de la sonda. Luego se realizó la introducción de la aguja a través de la pared vaginal y posteriormente a través de la pared folicular para proceder al aspirado del líquido folicular (Figura 18). Inmediatamente de recolectada la muestra, se conservó a temperatura de refrigeración (4-6°C) y se trasladó al laboratorio para su procesamiento. Cabe aclarar que esta técnica

también se realizó previamente a la ovariectomía en vacas con EQO, para evitar la ruptura de los quistes durante la misma.



Figura 18: Técnica de aspiración folicular. (A) Aplicación de anestesia epidural. (B) Colocación de la sonda intravaginal de aspiración. (C) Esquema de la posición de la sonda, y la sujeción del ovario vía transrectal. (D) Imagen ultrasonográfica en la que se observa la aguja de aspiración dentro del folículo a aspirar. (E) Recolección del líquido mediante bomba aspiradora. (F) Líquido folicular aspirado.

3.2.1.3.3. Obtención de ovario completo

La obtención de los ovarios completos se realizó mediante ovariectomía bilateral por laparotomía (abordaje por flanco izquierdo). El procedimiento se desarrolló con el animal en pie, sedándolo vía intramuscular con 6-8 mg de clorhidrato de xilazina (Xilazina 2%, Over®) y luego se realizó anestesia local infiltrativa según la técnica de Magda modificada (Garnero y Perusia, 2002), utilizando 160 ml de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2%, Over®), además de realizarse una epidural baja con 5 ml de lidocaína en el espacio sacrococcígeo.

Luego de realizar la tricotomía y preparación del campo quirúrgico, se procedió a realizar una incisión desde dorso-caudal hacia ventro-craneal en la piel del flanco y en los planos musculares que se encuentran por debajo de la misma, de una longitud suficiente para permitir al cirujano un cómodo acceso a la cavidad abdominal.

Posteriormente se localizó el ovario derecho y se colocó una pinza hemostática Kocher modificada *ad hoc* (sin dientes) y se realizó la ligadura del pedículo ovárico por transfixión con hilo no absorbible simple. Luego se procedió a la sección con tijera y extracción del ovario (el mismo procedimiento se realizó con el ovario izquierdo). A continuación, se realizó la sutura de los planos musculares y de la piel (Garnero y Perusia, 2002) (Figura 19). Por último, los animales fueron tratados durante 3 días con antibióticos, coagulantes, antiinflamatorios y antiparasitarios externos.



Figura 19: Técnica de ovariectomía bilateral, abordaje por flanco izquierdo. (A) Preparación del instrumental quirúrgico. (B) Aplicación de anestesia local infiltrativa. (C) Aplicación de anestesia epidural. (D) Incisión con bisturí en la piel del flanco. (E) Ovario sujetado con pinza hemostática. (F) Ligadura de ovarios por transfixión con hilo de lino. (G) Ovarios extraídos para su procesamiento.

3.2.1.4. Obtención de muestras: grupo frigorífico

En el caso del grupo proveniente de frigorífico, se tomaron muestras de ovario completo, muestras de líquido folicular (para la obtención de células de la granulosa) y muestras de teca.

3.2.1.4.1. Obtención de ovario completo

En el frigorífico se procedió a la recolección de ovarios con folículos antrales (controles) y con folículos compatibles con la descripción de quistes foliculares (Silvia y

col., 2002), dentro de los 20 minutos de sacrificio de los animales, considerando que los ovarios quísticos no presenten CL en el par completo. Los ovarios se colocaron en bolsas de polipropileno limpias y se transportaron al laboratorio, refrigerados, para su posterior procesamiento.

3.2.1.4.2. Obtención de líquido folicular

En el caso de los ovarios provenientes de frigorífico, estos fueron trasladados refrigerados al laboratorio y una vez allí, se realizó la aspiración manual de líquido folicular, tanto de los folículos antrales controles como de los folículos quísticos (Figura 20). Se utilizaron jeringas de 1 ml y agujas 25 G. El líquido obtenido se guardó para su posterior procesamiento.



Figura 20: Aspiración manual de líquido folicular de ovarios provenientes de frigorífico. (A) Medición del ovario y de la estructura quística. (B) Obtención del líquido folicular mediante aguja y jeringa.

3.2.2. Procesamiento de muestras

Las muestras derivadas de los tres grupos (Control, EQO espontánea y frigorífico) fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA)

del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

Las muestras procesadas en el laboratorio y su destino se observa en el esquema de la Figura 21.

Las muestras se procesaron y almacenaron adecuadamente para su posterior utilización en las distintas técnicas de biología molecular propuestas en esta tesis:

a) Muestras de sangre: las muestras obtenidas de vacas controles y de vacas con EQO, se mantuvieron a temperatura ambiente (22-25 °C) durante 30 min, se colocaron a 4 °C durante 1 h y finalmente se centrifugaron a 1000 *g* durante 10 min. Se separó el suero y se almacenó a -80 °C hasta su posterior utilización.

b) Muestras de líquido folicular y células de granulosa: obtenidas por aspiración folicular guiada por ecografía de folículos preovulatorios controles y quistes espontáneos, o mediante aspirado con jeringa y aguja en el caso de los ovarios de frigorífico (controles y quísticos). Se centrifugaron a 2000 *g* durante 10 min (centrifuga refrigerada IEC Multi RF, Thermo, USA) para la obtención del pellet de células de la granulosa, el cual se almacenó a -80 °C para su posterior utilización (para el caso de los ovarios de frigorífico). Por otro lado, el sobrenadante del líquido folicular se almacenó a -80 °C para diversas determinaciones hormonales (grupos control y EQO).

c) Muestras de teca: teniendo en cuenta la clasificación folicular anteriormente mencionada, se tomaron muestras de la teca de folículos terciarios de ovarios normales y quísticos, ambos de frigorífico, las cuales se lavaron con agua DEPC y se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento.

d) Muestras de pared folicular completa: se tomaron muestras de pared completa (teca y granulosa) de folículos antrales de ovarios controles. Se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento.

e) Muestras de ovarios enteros: luego de la extracción del líquido folicular y pared folicular (y/o teca), los ovarios fueron fijados en formol bufferado (10 %) durante 8-12 h a temperatura ambiente y se procesaron siguiendo protocolos de rutina hasta su inclusión en parafina.

TIPO DE MUESTRA	GRUPO	DESTINO
Ovario completo	⇒ CONTROL ⇒ EQO	IHQ INDIRECTA
Tejido ovárico: teca	⇒ FRIGORÍFICO (CONTROL /EQO)	PCR EN TIEMPO REAL
Aspiración folicular: líquido folicular	⇒ CONTROL ⇒ EQO	MEDICIONES HORMONALES
Aspiración folicular: cél. de la granulosa	⇒ FRIGORÍFICO (CONTROL /EQO)	PCR EN TIEMPO REAL
Sangre: suero	⇒ CONTROL ⇒ EQO	MEDICIONES HORMONALES

Figura 21: Esquema de la procedencia y destino de las muestras obtenidas.

3.2.2.1. Procesamiento de las muestras para RT-PCR

A) Extracción de ARN total

Para la obtención del ARN total a partir de tejido/células, se procedió de la siguiente manera:

a) Al precipitado conteniendo las **células de la granulosa**, se le agregó 750 µl del reactivo TRIzol® LS Reagent (Invitrogen). Las células fueron lisadas mediante el uso de un vórtex (ZX Classic, VELP Científica®).

b) Para la obtención de las **células de la teca**, se pesaron aproximadamente 60 mg de tejido congelado que fue lavado con agua DEPC 3 a 4 veces, mezclando en un vórtex y descartando el agua cada vez, para eliminar posibles células de la granulosa presentes. A continuación se agregaron 750 µl del reactivo TRIzol® LS Reagent (Invitrogen) y luego se procedió a la homogeneización del tejido con un homogeneizador manual (Ultra Turrax® IKA T10 Basic) hasta lograr la dispersión total del mismo.

A continuación, la suspensión de células de la granulosa o de la teca fue incubada durante 5 min a 4 °C y luego se agregaron 200 µl de cloroformo, agitando vigorosamente para favorecer el contacto entre las fases. La mezcla resultante fue incubada durante

1 min a 4 °C. Luego se centrifugó a 12000 *g* durante 20 min a 4 °C para permitir la diferenciación de las fases. La fase acuosa fue trasvasada a un tubo estéril, se adicionó igual volumen de isopropanol, y se incubó toda la noche a -20 °C para favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos de interés. Posteriormente, se centrifugó a 12000 *g* durante 20 min a 4 °C. El precipitado obtenido, correspondiente al ARN total, fue lavado con etanol 75 % y finalmente resuspendido y alicuotado en agua DEPC precalentada a 60 °C, libre de ARNasas.

B) Transcripción reversa

Para eliminar posibles contaminaciones del ARN con ADN genómico, se realizó un tratamiento con ADNasa (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las cadenas de ADN copia (ADNc) fueron sintetizadas usando una mezcla de reacción conteniendo MMLV (del inglés: *Moloney Murine Leukemia Virus*) buffer 5X, dithiothreitol (DTT, 100 mM), inhibidor de ribonucleasas (40 U/μl, RNaseOUT), retrotranscriptasa (MMLV, 200 U), dextrorribonucleótidos trifosfatos (dNTP) y cebadores con secuencia al azar. Se utilizó para ello una cantidad constante de ARN y fueron utilizadas las siguientes condiciones para la transcripción reversa:

- ✓ 10 min a 25 °C para el anillado.
- ✓ 50 min a 37 °C para la síntesis del ADNc.
- ✓ 15 min a 70 °C para la inactivación de la ADNasa.

Todas las reacciones se llevaron a cabo para un volumen final de 20 μl utilizando un termociclador estándar (TC-3000G, Techne Inc., NJ, USA).

El producto de la reacción, ADNc simple cadena, se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3.2.2.2. Procesamiento de las muestras para western blot

Se tomaron fracciones de aproximadamente 60 mg de pared folicular de folículos antrales grandes provenientes de ovarios de animales controles frigorífico, que fueron colocadas en buffer RIPA (del inglés: *radioimmunoprecipitation assay buffer*) con inhibidores de proteasas, luego fueron homogeneizadas con un homogeneizador de mano Ultra Turrax®. El sobrenadante se obtuvo luego de centrifugar las muestras a 14000 *g* en una centrífuga refrigerada durante 20 min. Una vez obtenidos los extractos

de proteínas se determinó la concentración proteica de cada muestra mediante el método fluorimétrico (Quant-iT Protein Assay Kit, Qubit, Invitrogen, Nueva York, Estados Unidos). Previamente a las lecturas, se utilizó un patrón de referencia para realizar la curva de calibrado.

3.2.2.3. Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas

Las muestras de ovarios enteros fueron procesadas mediante técnicas histológicas de rutina. Luego de la fijación con formol tamponado al 10%, las muestras fueron lavadas en buffer fosfato salino (PBS), reducidas en su tamaño y procesadas siguiendo el protocolo descrito por Salvetti y col. (2010) para efectuar la inclusión en parafina. Para ello, las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol, aclaradas por pasajes xilol y finalmente incluidas en parafina.

Se efectuaron cortes seriados de 4 μm de espesor con un micrótopo rotativo (Leica RM2245), los que se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropil-triethoxisilane (Sigma, USA), y luego se secaron en estufa a 37 °C durante 24 h. Para hacer una caracterización inicial y evidenciar la morfología de las distintas estructuras ováricas se utilizó la coloración de hematoxilina-eosina.

3.2.3. Cuantificación de hormonas en suero y líquido folicular

3.2.3.1. Determinación de 17 β -estradiol, progesterona y testosterona

Los niveles de 17 β -estradiol, progesterona y testosterona en suero y líquido folicular se midieron mediante kits de inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA del inglés: *electrochemiluminescence immunoassay*) (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) en un sistema COBAS e411 (Roche Diagnostics), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que se validaron previamente en bovinos (Díaz y col., 2015). La sensibilidad del ensayo fue de 5,00 pg/ml para el 17 β -estradiol, 0,03 ng/ml para la progesterona y 0,02 ng/ml para la testosterona.

3.2.3.2. Determinación de insulina

Las concentraciones séricas e intrafoliculares de insulina fueron analizadas mediante radioinmunoanálisis (RIA). La concentración de insulina fue medida utilizando un anticuerpo anti-insulina bovina (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) y un estándar de insulina humana provisto por Laboratorios Beta (Buenos Aires, Argentina); la concentración detectable mínima fue de 0,05 ng/ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron siempre inferiores al 8 % y al 11 %, respectivamente. Las determinaciones fueron llevadas a cabo en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME, CONICET, Buenos Aires).

3.2.4. Evaluación semicuantitativa de la expresión génica de *panAkt*, *mTOR*, *StAR*, *3 β -HSD*, *CYP19A1*, *CYP17A1*

La evaluación de la expresión génica se realizó mediante PCR en tiempo real sobre muestras de células de la granulosa y de la teca provenientes de ovarios controles y de ovarios quísticos obtenidos en la playa de faena, en frigoríficos de la zona. Como gen constitutivo de referencia se evaluó la expresión de GAPDH.

Para la evaluación por PCR en tiempo real, las muestras se seleccionaron teniendo en cuenta la siguiente clasificación folicular, obtenida de reportes previos (Parrott y Skinner, 1998; Silvia y col., 2002):

- Folículos antrales pequeños: < 5 mm
- Folículos antrales medianos: 5-10 mm
- Folículos antrales grandes: >10 mm
- Quistes foliculares: \geq 20 mm (con ausencia de cuerpo lúteo en ambos ovarios)

3.2.4.1. Diseño de cebadores específicos

A partir de las secuencias de ADNc obtenidas de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.htm>) fueron diseñados los cebadores específicos para las secuencias correspondientes a *panAkt*, *mTOR*, *StAR*, *3 β -HSD*, *CYP19A1*, *CYP17A1*. En los casos en que fue posible, se consideró que el producto

amplificado con cada par de cebadores se corresponda al ensamble de dos o más intrones del gen de interés. Para el diseño y posterior verificación de su especificidad, se utilizó la aplicación PrimerSelect del programa LASER GENE (DNAS^tAR, WI, USA). Todos los oligonucleótidos utilizados fueron provistos por Invitrogen.

Para identificar las poblaciones celulares se emplearon cebadores específicos para amplificar las secuencias codificantes de los genes *CYP19A1* (específico de células de la granulosa, correspondiente a la enzima P450arom) y *CYP17A1* (específico de células de la teca, correspondiente a la enzima P450c17), los mismos fueron diseñados por Lagaly y col. (2008). Las secuencias de los distintos cebadores se muestran en la Tabla 1.

3.2.4.2. Procesamiento del ADNc

La concentración de ADNc, que fue obtenido según se detalla previamente, se determinó mediante un método fluorimétrico (QubitTM, Invitrogen). Brevemente, se incubó una alícuota de cada muestra de ADNc con las cantidades correspondientes de buffer de reacción y reactivo de color (Invitrogen) a 25°C, y luego se realizó la lectura de la concentración en el equipo Qubit.

3.2.4.3. Análisis de las poblaciones foliculares

Se realizaron reacciones de amplificación por PCR de punto final utilizando los cebadores específicos para *CYP19A1* y *CYP17A1* descritos en la Tabla 1. Dichas determinaciones permitieron confirmar y evaluar las poblaciones celulares ováricas. A través de esta identificación las muestras se clasificaron en: positivas para *CYP19A1* (células de la granulosa) y positivas para *CYP17A1* (células de la teca), descartando del análisis aquellas muestras positivas a ambos.

Las PCR se realizaron en un termociclador TC-3000G (Techne Inc., NJ, USA) de acuerdo a las condiciones estandarizadas para cada par de cebadores. Se incluyeron en ambos casos controles negativos (reemplazando el ADNc por agua DEPC) y positivos (utilizando ADNc de pared folicular completa).

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo 10 ng de ADNc, cebadores (20 µM), 2,5 µl de buffer Taq 10X (50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP; y 2 U Taq polimerasa (5 U/µl) (todos los reactivos fueron provistos por Invitrogen).

El programa utilizado incluyó un tiempo inicial de desnaturalización de 3 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de: 45 segundos a 94 °C para la desnaturalización del ADNc, 30 segundos a 60,8 °C (para *CYP17A1*) o 55,4 (para *CYP19A1*) para la hibridación de los cebadores y 1 min 30 segundos a 72 °C para la extensión a partir de los mismos. Un último paso a 72 °C durante 10 min fue necesario para la extensión final de todos los productos amplificados.

Los productos de todas las PCR fueron sembrados en geles de agarosa al 2 % conteniendo solución tamponada TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 0,5 mM EDTA, pH 8,0) y colorante de ácidos nucleicos GelRed 1X (Biotium, CA, USA). Paralelamente a las muestras, se sembró 1 µl del marcador de pares de bases (Ladder 100 pb, PBL Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina) con el objetivo de determinar la correspondencia del producto amplificado con el tamaño esperado. La electroforesis se efectuó a voltaje constante (80 V). Las bandas obtenidas se visualizaron en el gel bajo luz UV de un transiluminador (Labnet, Edison, Estados Unidos).

3.2.4.5. Amplificación mediante PCR en tiempo real

Se utilizó un protocolo de PCR en tiempo real optimizado para analizar la expresión de ARNm de los genes utilizando SYBR Green I (Invitrogen) (Pfaffl, 2001) y según la guía de MIQE (Bustin y col. 2009). Como gen de referencia se utilizó GAPDH. Las PCR se realizaron usando concentraciones definidas de cebadores *forward/reverse* específicos como se detalla en la Tabla 1.

Cada reacción de PCR se realizó por duplicado en un volumen total de 20 µl que contenía 4 µl de cDNA (500 ng/ml), 4 µl de buffer de reacción Phire 5X, 0,5 µl de cada 10 mM de cebadores, 0,2 mM dNTPs, 1 µl SYBR Green I (Invitrogen), 0,05 µl Phire Taq polimerasa (Thermo Fisher Scientific Company, Finlandia) y 14 µl de agua tratada con DEPC estéril.

Los niveles relativos de transcriptos se midieron en el termociclador StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technology, CA, USA) y se analizaron mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Se utilizaron las siguientes condiciones térmicas: 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 5 segundos, la temperatura de anillado se detalla en la Tabla 1, se realizó durante 20 segundos, y la extensión a 72°C durante 25 segundos. Se realizó un único paso de desnaturalización inicial a 98 °C durante 3 min y un paso de extensión final a 72°C durante 10 min.

La eficiencia de las PCR y las cantidades relativas se determinaron a partir de una curva estándar de seis puntos. Las curvas estándar se construyeron a partir de una serie de diluciones de un *pool* de ADNc y la eficiencia de PCR se calculó usando el software StepOne v2.2 (Applied Biosystems).

Los niveles de expresión de ARNm de los genes se registraron según los valores de sus C_t (ciclo umbral, del inglés: *cycle threshold*) valor que corresponde al número de ciclos en los que la señal de fluorescencia podría detectarse por encima de un valor umbral y se calculó usando StepOne v2.2. Se incluyeron controles negativos (agua tratada con DEPC) en todos los ensayos. La pureza del producto se estableció mediante curvas de disociación y las muestras (aleatorias) se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para verificar los tamaños de los productos.

3.2.4.6. Análisis de la secuencia nucleotídica

La identidad de los productos de PCR se confirmó mediante secuenciación de ADN usando el servicio de secuenciación de MacroGen Sequencing Service (MacroGen, Korea). Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando el software BioEdit Sequence Alignment Editor y posteriormente fueron evaluadas, mediante la herramienta BLAST, para verificar los porcentajes de similitud con las secuencias depositadas en GenBank.

Tabla 1: Pares de cebadores (secuencia de cebadores *forward/reverse*, 5'→3') usados para PCR en tiempo real.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Nº de GenBank	Longitud del producto	Tº de anillado
panAKT <i>Forward</i>	GCCGCCTGCCCTTCTACA	X61036.1	174 pb	60°C
<i>Reverse</i>	TGATCTCCTTGGCGTCCTCAG			
mTOR <i>Forward</i>	ACAATAGCTCAGGCCGCATCGTCT	XM2694043.1	127 pb	60°C
<i>Reverse</i>	GCTTCGGGGGCGTCAAATAACTTC			
StAR <i>Forward</i>	GGAGGAGATGGCTGGAAGAAGGT	NM_174189.2	174 pb	59 °C
<i>Reverse</i>	TGCTGTAGCACTGGAATGGAACA			
3β-HSD <i>Forward</i>	ACCTGGGAGTGACAATGATGGGAA	NM_174343.3	161 pb	60 °C
<i>Reverse</i>	TCTGGTGGCGGAAGGCAGATAGTA			
CYP17A1 <i>Forward</i>	CCAGTTGGCCAGGGAGGTG	NM_174304.2	168 pb	61°C
<i>Reverse</i>	AACAGGGCAAAGGCATTCACTG			
CYP19A1 <i>Forward</i>	GGGCCTGTGCGGGAAAAGTA	NM_174305.1	145 pb	60 °C
<i>Reverse</i>	TCGTCTGGATGCAAGGATAAGTCA			
GAPDH <i>Forward</i>	CAC CCT CAA GAT TGT CAG CA	BC102589	103 pb	52 °C
<i>Reverse</i>	GGT CAT AAG TCC CTC CAC GA			

3.2.5. Detección y cuantificación de intermediarios de la cascada de señalización de insulina y esteroidogénesis

3.2.5.1. Western blot

Mediante análisis western blot, se determinó la especificidad de los anticuerpos que se utilizaron para detección de proteínas por inmunohistoquímica. Además, se realizó el análisis BLAST (análisis de homología de las proteínas contra las cuales se usan anticuerpos reactivos para especies diferentes a la de *Bos taurus*) para todos los anticuerpos utilizados, arrojando resultados de homología entre 84 % y 99 %.

Se realizó la electroforesis en geles discontinuos de poliácridamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El tamaño del poro para el gel de resolución se correspondió con una concentración de acrilamida del 8 %, 10 % y 12 %, 57

según la proteína a detectar. Se utilizaron homogeneizados de pared folicular de folículos antrales controles, obtenidos de ovarios de frigorífico (Parrott y Skinner, 1998).

Se prepararon las muestras obtenidas por homogeneización, diluyendo convenientemente con buffer de muestra en condiciones reductoras para SDS-PAGE, y posteriormente se incubaron en baño termostático en ebullición por 5 min. Según los valores obtenidos de la cuantificación mediante el método fluorimétrico (Quant-iT Protein Assay Kit, Qubit, Invitrogen) se sembraron 40 µg de proteínas. Se realizó la electroforesis a 25 mA para el gel de apilamiento, y se continuó a 50 mA en el gel de resolución en una cuba vertical y utilizando el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1 % de SDS, pH 8,3. Luego, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa, en frío, a 100V durante 1:30 h utilizando buffer de transferencia Towbin modificado (Tris-Glicina y 20% de metanol). Las membranas obtenidas se colorearon con el colorante Rojo Ponceau para comprobar la efectividad de la transferencia, luego se lavaron con agua destilada para eliminar el colorante y se almacenaron a 4°C hasta el momento de la inmunodetección de las proteínas detalladas en la Tabla 2.

Para la inmunodetección de las proteínas en las membranas de nitrocelulosa se empleó el siguiente protocolo:

- 1) Hidratación de la membrana, 10 min a temperatura ambiente con tris buffer salino-tween 20 (TBS-T).
- 2) Bloqueo los sitios de unión inespecíficos con TBS-T leche 5%, 5 horas a temperatura ambiente y en agitación.
- 3) Lavado a temperatura ambiente en agitación (agitador orbital BOECO OS-10, Alemania) con TBS-T: 2 lavados rápidos y 5 lavados de 5 min.
- 4) Incubación con el anticuerpo primario (Tabla 2) durante toda la noche a 4 °C. Para la dilución del anticuerpo primario se utilizó TBS-T BSA 0,5%.
- 5) Lavado a temperatura ambiente en agitación con TBS-T: 2 lavados rápidos y 5 lavados de 5 min.
- 6) Incubación con el anticuerpo secundario (Tabla 2) durante una 1:30 h a temperatura ambiente en agitación. Para la dilución se utilizó TBS-T BSA 0,5%.
- 7) Lavado a temperatura ambiente en agitación con TBS-T: 2 lavados rápidos y 5 lavados de 5 min.
- 8) Incubación con reactivo quimioluminiscente (ECL Plus, GE Healthcare).

9) Exposición de la membrana en placas radiográficas (GE Helthcare) en cuarto oscuro, y revelado de la misma con los reactivos de revelado y fijado (Kodak).

Tabla 2: Anticuerpos, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de western blot.

Anticuerpo primario	Dilución	PM	Anticuerpo secundario	Dilución
p-ERK 1/2 (Thr 202) Policlonal (sc-101760, Santa Cruz)	1:100	42-44 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1:7500
pan-AKT Policlonal (ab-18785, Abcam)	1:500	56 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1:7500
mTOR (phospho S2448) Policlonal (ab-51044, Abcam)	1:400	289 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1:7500
StAR Policlonal (ab-3343, Abcam)	1:500	30 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1:7500
3β-HSD Policlonal (Donación de J.I. Mason PhD, FRC Path, Univ. Of Edinburgh)	1:3000	42 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1:7500
CYP17A1 Monoclonal (Donación de Dr. C.R. Parker Jr., Univ. Of Alabama at Birmingham)	1:200	55 kDa	Goat anti-mouse IgG HRP (sc-2005, Santa Cruz)	1:6000
CYP19A1 (H-300) Policlonal (sc-30086, Santa Cruz)	1:1000	58 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1:7500

3.2.5.2. Inmunohistoquímica indirecta

Se utilizaron cortes histológicos ováricos de animales controles y con EQO espontánea, procesados de acuerdo a lo desarrollado en el apartado anterior, para localizar y cuantificar la expresión proteica de p-ERK1/2, panAkt, p-mTOR, StAR, 3 β -HSD, CYP19A1 y CYP17A1 por inmunohistoquímica indirecta con los anticuerpos específicos comerciales detallados en la Tabla 3.

Las inmunodetecciones se realizaron sobre cortes de 4 μ m de espesor, según se detalla a continuación:

- 1) Acondicionamiento de los cortes durante 10 min en estufa a 60 °C.
- 2) Desparafinización en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 y 10 min, respectivamente.

- 3) Hidratación seriada en alcoholes de graduación decreciente, a partir de etanol absoluto (dos pasajes de 2 min), etanol 96° (un pasaje de 2 min) y finalmente etanol 70° (un pasaje de 2 min).
- 4) Lavado en PBS pH 7,2 durante 5 min.
- 5) Tratamiento de recuperación antigénica. Se realizaron distintos tipos de tratamiento de acuerdo al anticuerpo primario, detallados en la Tabla 3.

Recuperación antigénica:

Recuperación convencional en microondas: en horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 800 W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato 0,01 M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un recipiente coplin sumergido parcialmente en un baño con agua destilada, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 3 min al 100% de potencia, 6 min al 40% de potencia, 6 min al 40% y 20 min dentro del microondas apagado. Entre los diferentes pasos se recargó el recipiente coplin con agua destilada en ebullición.

Recuperación intensa en microondas: en horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 800 W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato 0,01 M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un recipiente de coplin sumergido en un baño con agua, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 5 minutos a 100 % de potencia, recarga del coplin con agua destilada, 5 minutos a 100 % de potencia, recarga del coplin con agua destilada, 6 minutos al 40 %, recarga del coplin con agua destilada, 6 minutos al 40 % y 20 minutos dentro del microondas apagado. Entre los diferentes pasos se recargó el recipiente coplin con agua destilada en ebullición.

Recuperación en Olla a presión: Se precalentó un coplin con buffer EDTA 1 mM-Tween 0,05 %, pH 8,0 durante 20 min en olla presión. Luego, se colocaron los preparados en el coplin e incubaron durante 20 min con fuego máximo. Finalmente se dejó enfriar 20 min dentro de la olla destapada con el fuego apagado.

- 6) Lavado en PBS durante 5 min.
- 7) Inactivación de la peroxidasa endógena: se incubaron los cortes durante 10 min en una solución al 3 % de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno por 10 minutos más.
- 8) Se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS.

9) Bloqueo de los sitios de unión no-específicos incubando 15 min a temperatura ambiente en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra al 10 % o suero normal de burro 10 %, según corresponda (detallado en la Tabla 3).

10) Incubación en cámara húmeda con anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C en las diluciones adecuadas para las proteínas a detectar (detallado en la Tabla 3). Para los controles de especificidad (controles negativos) se sustituyó el anticuerpo primario por PBS-BSA.

11) Lavados durante 5 min en PBS.

12) Incubación en cámara húmeda con anticuerpo secundario (detallado en la Tabla 3), durante 30 min a temperatura ambiente.

13) Lavados durante 5 minutos en PBS.

14) Incubación con complejo streptavidina-peroxidasa (Cytoscan HRP Detection System Cell Marque) durante 30 min a temperatura ambiente.

15) Lavados durante 5 min en PBS.

16) Revelado de la reacción con 3-3'-diaminobencidina (Kit DAB Plus, Invitrogen). Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y estandarizarlo.

17) Lavados de 5 min en agua destilada. Coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur®), deshidratación y montaje con bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur®) y cubreobjetos apropiados.

Tabla 3: Anticuerpos, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de inmunohistoquímica

Anticuerpo primario	Condiciones	Recuperación antigénica	Tipo de bloqueo	Anticuerpo secundario
p-ERK 1/2 (Thr 202) Policlonal (sc-101760, Santa Cruz)	1/100 Toda la noche a 4°C	Microondas convencional	Suero normal del cabra al 10%	Goat anti-rabbit IgG biotinilado (sc- 2040, Santa Cruz)
pan-AKT Policlonal (ab-18785, Abcam)	1/50 Toda la noche a 4°C	Sin recuperación	Suero normal del cabra al 10%	Secundario universal (CytoScan HRP detection system- Cell Marque)
mTOR (phospho S2448) Policlonal (ab-51044, Abcam)	1/100 Toda la noche a 4°C	Microondas convencional	Suero normal del cabra al 10%	Goat anti-rabbit IgG biotinilado (sc- 2040, Santa Cruz)
StAR Policlonal (ab-3343, Abcam)	1/75 Toda la noche a 4°C	Sin recuperación	Suero normal del cabra al 10%	Goat anti-rabbit IgG biotinilado (sc- 2040, Santa Cruz)
3β-HSD Policlonal (Donación de J.I. Mason PhD, FRC Path, Univ. Of Edinburgh)	1/750 Toda la noche a 4°C	Sin recuperación	Suero normal del cabra al 10%	Goat anti-rabbit IgG biotinilado (sc- 2040, Santa Cruz)
CYP17A1 Monoclonal (Donación de Dr. C.R. Parker Jr., Univ. Of Alabama at Birmingham)	1/100 Toda la noche a 4°C	Microondas convencional	Sin bloqueo	Secundario universal (CytoScan HRP detection system- Cell Marque)
CYP19A1 (H-300) Policlonal (sc-30086, Santa Cruz)	1/75 Toda la noche a 4°C	Olla a presión	Suero normal del cabra al 10%	Goat anti-rabbit IgG biotinilado (sc- 2040, Santa Cruz)

3.2.5.2.1. Análisis digital de imágenes

Para la evaluación de todos los anticuerpos, en los grupos control y EQO espontánea, se digitalizaron imágenes de ambas capas de la pared folicular (granulosa y teca) de folículos primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales (en todos los grupos), y folículos quísticos (en el grupo de EQO espontánea). Las imágenes de los preparados histológicos fueron digitalizadas mediante una cámara digital (Nikon DS-Fi2 Tokyo, Japan), acoplada a un microscopio óptico (Nikon Eclipse Ni) utilizando un objetivo de 40X de aumento. La resolución de las imágenes fue establecida en 1200 x 1600 píxeles.

Las imágenes fueron analizadas usando el analizador digital de imágenes Image Pro-Plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA) según estudios que realizamos previamente (Ortega y col., 2009, 2010; Rey y col., 2010; Salvetti y col., 2010; Rodríguez y col., 2015). La densidad media (porcentaje de área inmunopositiva) para cada anticuerpo se calculó como el porcentaje del área total evaluada a través de un análisis de segmentación de colores, el cual extrae objetos mediante la localización de todos los objetos de un color específico (tinción marrón). Estos valores se verificaron y normalizaron con controles evaluados en varios ensayos, usando la misma región (verificada por comparación de imágenes) para la calibración. El porcentaje de área inmunopositiva o área inmunomarcada, se calculó separadamente para cada compartimiento (granulosa y teca interna). Las secciones fueron analizadas sin considerar los grupos de pertenencia.

3.2.5.2.2. Clasificación de los folículos ováricos

Para realizar el análisis sistemático de los folículos presentes en el ovario utilizamos la clasificación específica para la especie bovina descrita por Braw-Tal y Yossefi (1997). De acuerdo a dicha clasificación, los folículos primordiales (tipo I) están caracterizados por un ovocito quiescente, rodeado por un número limitado (<10) de células de la granulosa planas. En una primera fase de crecimiento, las células de la granulosa se transforman y pasan de ser células planas a cúbicas y su número se incrementa. Inicialmente se forma una categoría folicular intermedia llamada folículo de

transición (tipo I+) en los cuales se pueden observar tanto células de la granulosa planas como cúbicas rodeando al ovocito. Un folículo primario (tipo II) está caracterizado por una capa completa o una capa y media de células de la granulosa cúbicas, rodeada por una lámina basal. En una segunda fase de crecimiento la capa de células de la granulosa continúa creciendo. Cuando éstas llegan a ser al menos alrededor de 40, se evidencia el inicio del crecimiento del ovocito por un rápido aumento de su diámetro. El crecimiento del ovocito también induce la formación de la zona pelúcida, siendo esta capa parcialmente formada en los folículos preantrales pequeños (tipo III), y completa en los folículos preantrales grandes (tipo IV) (Braw-Tal y Yossefi, 1997). Las células de la teca derivan del estroma intersticial y se distinguen completa y claramente en los folículos tipo IV. La formación del antro folicular comienza cuando el folículo alcanza las 250 células de la granulosa, y entonces el folículo pasa a llamarse “antral” (tipo V) (Smitz y Cortvrindt, 2002) (Tabla 4).

Tabla 4: Clasificación morfológica de folículos ováricos más empleada para bovinos.

Folículo	Capas de CG	Nº de CG	Diámetro folicular (µm)	Diámetro del ovocito (µm)	Presencia de ZP	Presencia de TI
Primordial (Tipo I)	1	< 10 planas	<40	30	No	No
Primario (Tipo II)	1-1,5	10-40 cúbicas	40-80	31	No	No
Preantral pequeño (Tipo III)	2-3	41-100	81-130	49	No	No
Preantral grande (Tipo IV)	4-6	101-250	131-250	69	+	+
Antral (Tipo V)	>6	>250	250-500	93	++	++

CG: Células de la granulosa. Nº: Número. ZP: Zona pelúcida. TI: Teca interna. Adaptado de Braw-Tal y Yossefi, 1997; Aert y Bols, 2010.

Además de la clasificación mencionada, para el caso del grupo EQO, los folículos quísticos fueron identificados al examen histopatológico. Se definieron como estructuras foliculares con un antro evidente, un número variable de capas de células de la granulosa y con pérdida parcial de la estructura de la membrana basal, sin signos de luteinización en las poblaciones celulares analizadas (granulosa y teca) (Silvia y col., 2002; Monniaux y col., 2008).

3.2.6. Evaluación estadística

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 15.0.1 para Windows (Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las pruebas de homogeneidad de la varianza entre grupos se realizó mediante un test de Levene y la normalidad se verificó por el test de Kolmogorov-Smirnov.

Las concentraciones séricas y en líquido folicular de 17β -estradiol, progesterona, testosterona e insulina en los animales controles y EQO fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan.

Para evaluar la expresión proteica mediante inmunohistoquímica, se realizó un análisis de la varianza de los datos aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan. Se analizaron por separado las estructuras foliculares análogas (folículos primarios, preantrales pequeños y grandes, y antrales) de cada grupo en estudio. También se compararon los quistes espontáneos con los folículos antrales del grupo control (como estructuras de referencia). Además, se evaluó el comportamiento de la expresión proteica a lo largo de la foliculogénesis dentro de cada grupo en estudio. La comparación entre dos grupos de muestras se realizó mediante la prueba t-Student.

Para todos los análisis estadísticos, un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo. Los valores se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM).

3.3. CAPÍTULO I:

Resultados

3.3.1. Cuantificación de hormonas esteroides

Las concentraciones de 17β -estradiol, progesterona y testosterona se determinaron en líquido folicular de folículos preovulatorios y quistes de animales de los grupos control y EQO espontánea, respectivamente. Además, dichas hormonas se midieron en suero de animales de ambos grupos.

Las concentraciones de 17β -estradiol y testosterona fueron similares tanto en suero como en líquido folicular de ambos grupos ($p > 0,05$). Las concentraciones de progesterona fueron mayores en suero y líquido folicular del grupo control que en el grupo EQO ($p < 0,05$) (Tabla 5).

Tabla 5: Concentración de 17β -estradiol, progesterona y testosterona en suero y líquido folicular de animales control (folículo preovulatorio, proestro) y con EQO espontánea. Los valores representan la media \pm EEM. Diferentes letras indican diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0,05$).

	17 β-estradiol (ng/ml)	Progesterona (ng/ml)	Testosterona (ng/ml)
Suero			
Control	0,012 \pm 0,001	0,94 \pm 0,18 ^a	27,21 \pm 7,74
EQO	0,018 \pm 0,001	0,56 \pm 0,08 ^b	52,71 \pm 6,45
Líquido Folicular			
Control	360,53 \pm 48,04	62,84 \pm 5,84 ^a	17,29 \pm 2,04
EQO	269,77 \pm 24,49	38,54 \pm 4,82 ^b	22,76 \pm 3,76

3.3.2. Cuantificación de insulina

Las concentraciones de insulina se determinaron en líquido folicular de folículos preovulatorios y quistes de animales de los grupos control y EQO espontánea, respectivamente, y además, en suero de ambos grupos.

Las concentraciones de insulina fueron similares en líquido folicular de folículos preovulatorios y en quistes espontáneos ($p > 0,05$). Sin embargo, en suero se determinó una mayor concentración de insulina en vacas del grupo control, respecto a las vacas con EQO ($p < 0,05$). Comparando las concentraciones de insulina entre líquido folicular y

suero de un mismo grupo, se registraron mayores niveles de insulina en suero ($p < 0,05$) (Figura 22).

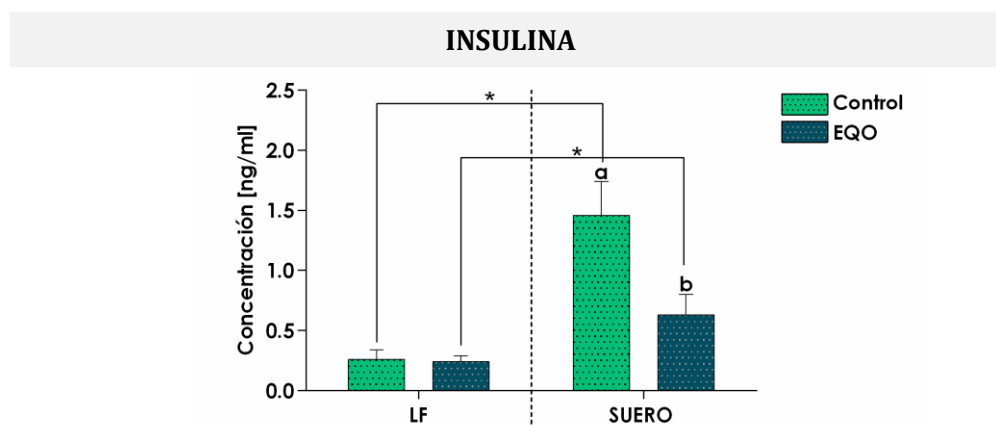


Figura 22: Concentración de insulina en líquido folicular (LF) y suero en animales de los grupos control y EQO espontánea. Las barras representan las medias \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre LF y suero del mismo grupo.

3.3.3. Expresión génica de *panAkt*, *mTOR*, *StAR*, *3 β -HSD*, *CYP19A1* y *CYP17A1*

La expresión génica de *panAkt*, *mTOR*, *StAR*, *3 β -HSD*, *CYP19A1* y *CYP17A1* se determinó por PCR en tiempo real en muestras de ovarios controles y quísticos de frigorífico. Todas las muestras de granulosa fueron positivas para el ARNm de *CYP19A1* y negativas para *CYP17A1*, en cambio, las muestras de teca fueron positivas para *CYP17A1* y negativas para *CYP19A1*. De este modo, se descarta contaminación entre ambas poblaciones celulares. La identidad de los productos de PCR fue confirmada por secuenciación (rango 97-99% de homología con secuencias de referencia bovina). No se observaron diferencias en la expresión del gen *GAPDH* entre los diferentes grupos evaluados ($p > 0,05$).

3.3.3.1. Expresión génica de *panAkt*

Se detectó la expresión de *panAkt* en las células de la granulosa y de la teca de folículos pequeños, medianos y grandes del grupo control y en folículos quísticos. En células de la granulosa no se observaron diferencias significativas entre las diferentes

categorías foliculares ($p > 0,05$). Sin embargo, en las células de teca los niveles de ARNm de *panAkt* fueron mayores en los folículos medianos respecto a los folículos grandes del grupo de control ($p < 0,05$), sin detectarse diferencias entre los folículos controles y los quistes ($p > 0,05$) (Figura 23).

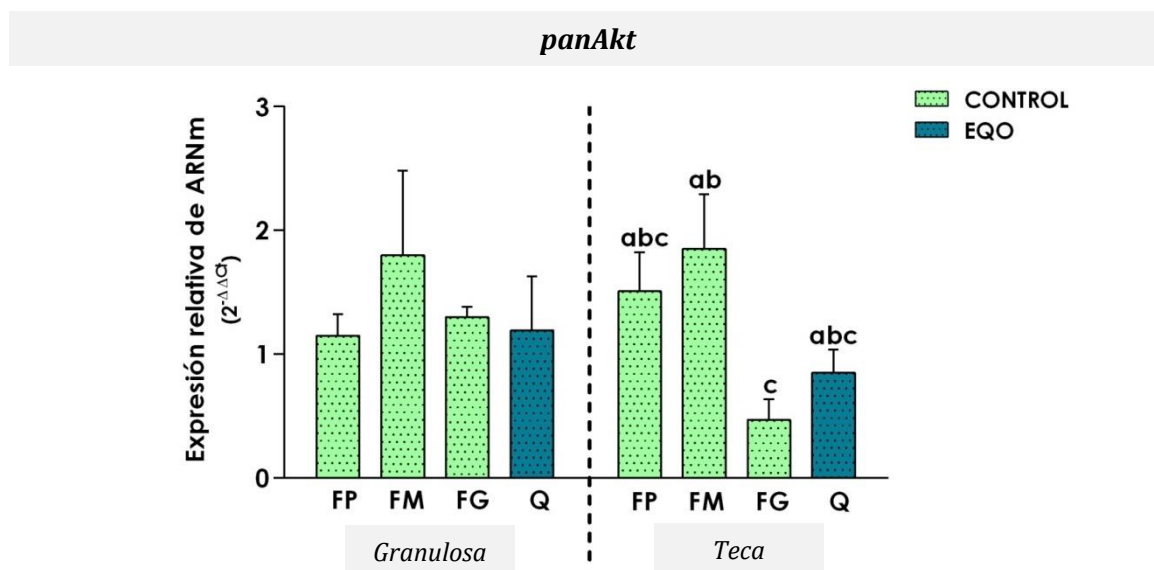


Figura 23: Niveles de ARNm correspondientes a *panAkt* en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y quistes foliculares espontáneos (Q). Los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ se presentan como la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$).

3.3.3.2. Expresión génica de *mTOR*

Se detectó expresión de *mTOR* en las células de la granulosa y de la teca de folículos pequeños, medianos y grandes del grupo control y en folículos quísticos. En las células de la granulosa, los niveles de ARNm de *mTOR* fueron mayores en los folículos antrales medianos que en las otras estructuras foliculares en las vacas control y EQO ($p < 0,05$), mientras que en las células teca los niveles de *mTOR* fueron similares en los diferentes folículos controles y quistes ($p > 0,05$) (Figura 24).

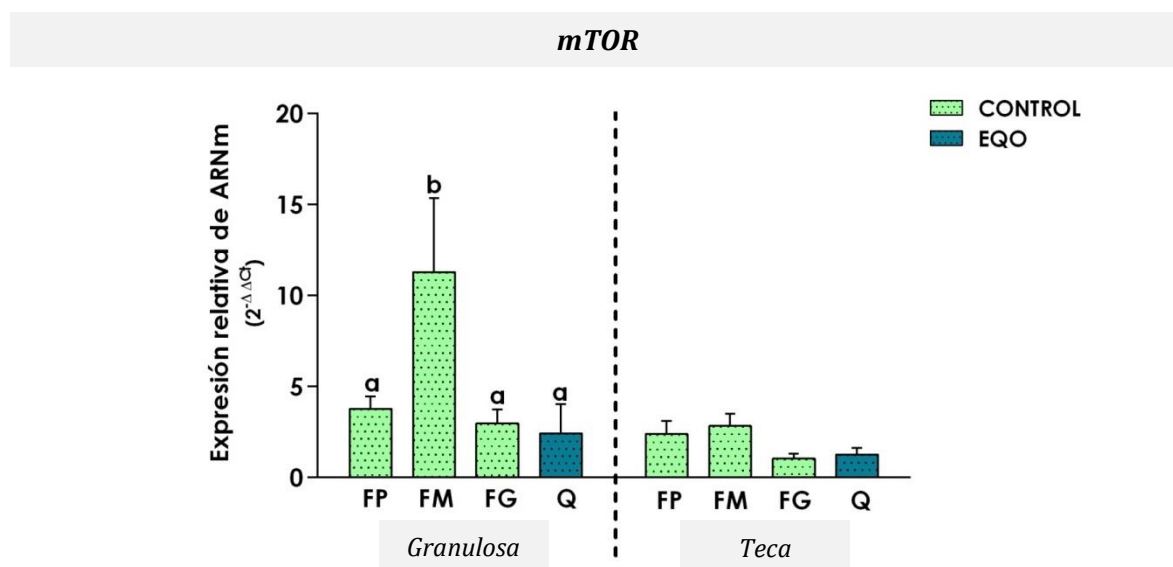


Figura 24: Niveles de ARNm correspondiente a *mTOR* en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y quistes foliculares espontáneos (Q). Los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ se presentan como la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas entre los diferentes tipos de folículos ($p < 0,05$).

3.3.3.3. Expresión génica de *StAR*

Se detectó expresión de *StAR* en células de la teca de folículos pequeños, medianos y grandes del grupo control y en folículos quísticos. En las células de la granulosa, se registraron niveles bajos de *StAR* en un número no significativo de folículos antrales y, en consecuencia, no se pudo realizar el análisis estadístico. En las células de la teca se detectaron niveles similares de ARNm en los folículos analizados ($p > 0,05$) (Figura 25).

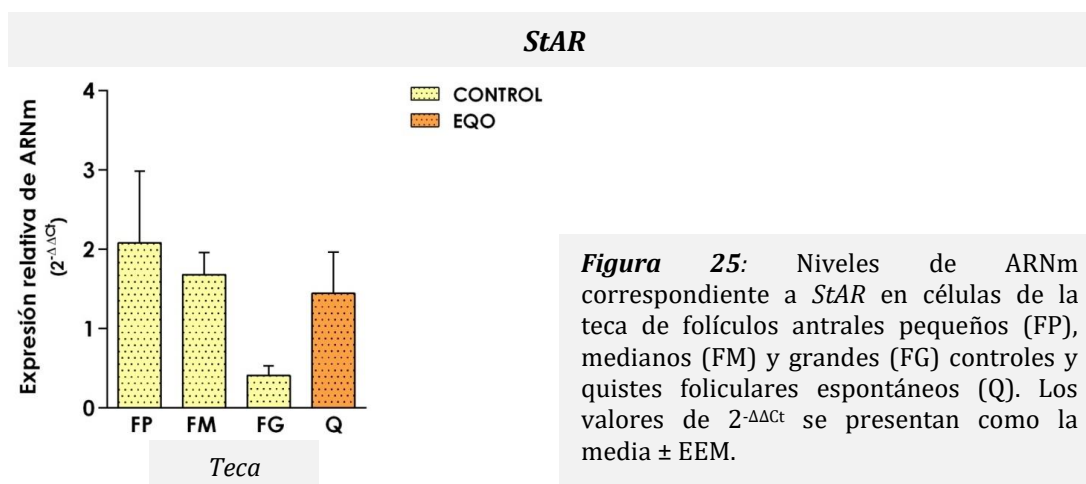


Figura 25: Niveles de ARNm correspondiente a *StAR* en células de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y quistes foliculares espontáneos (Q). Los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ se presentan como la media \pm EEM.

3.3.3.4. Expresión génica de 3β -HSD

Se detectó expresión de 3β -HSD en células de la granulosa y de la teca de folículos pequeños, medianos y grandes del grupo control y en folículos quísticos. En las células de la granulosa los niveles de ARNm de 3β -HSD fueron mayores en los folículos medianos que en las demás estructuras ($p < 0,05$). En las células teca se registraron niveles más altos en los folículos pequeños que en los folículos grandes y quistes ($p < 0,05$) (Figura 26).

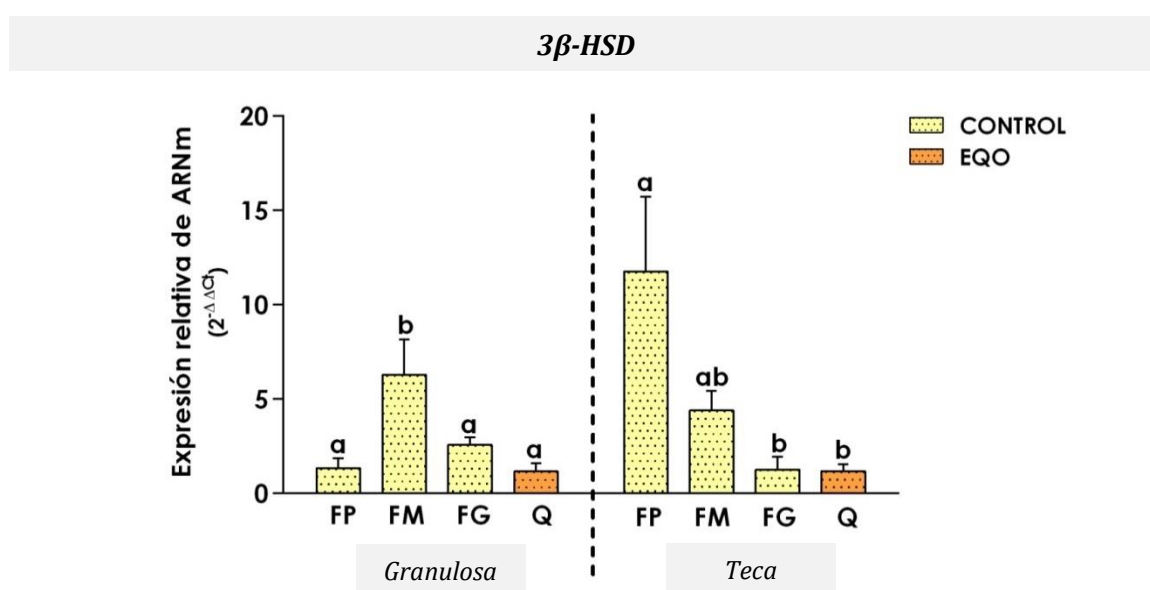
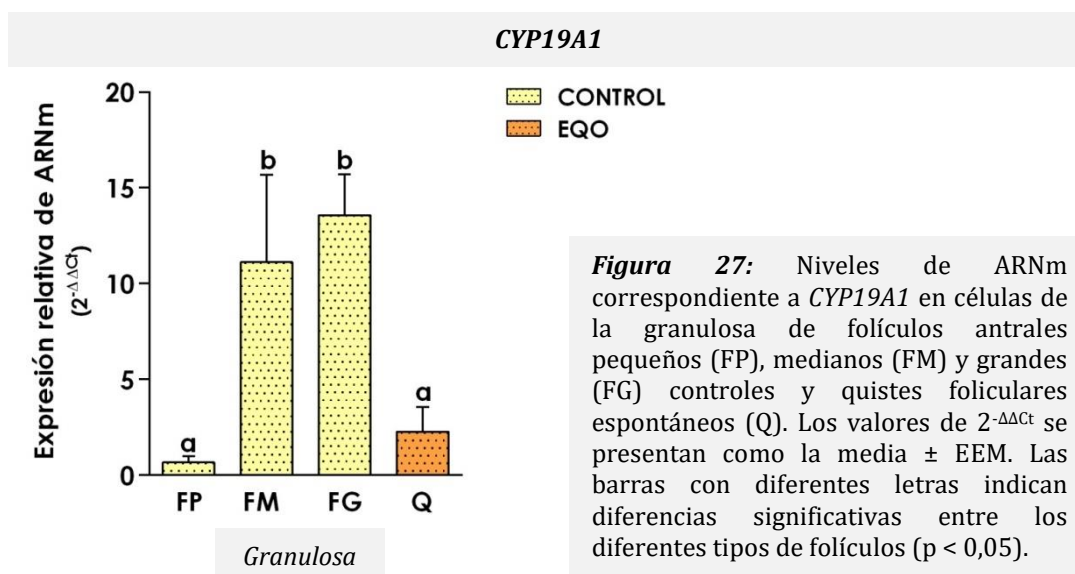


Figura 26: Niveles de ARNm correspondiente a 3β -HSD en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y quistes foliculares espontáneos (Q). Los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ se presentan como la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas entre los diferentes tipos de folículos ($p < 0,05$).

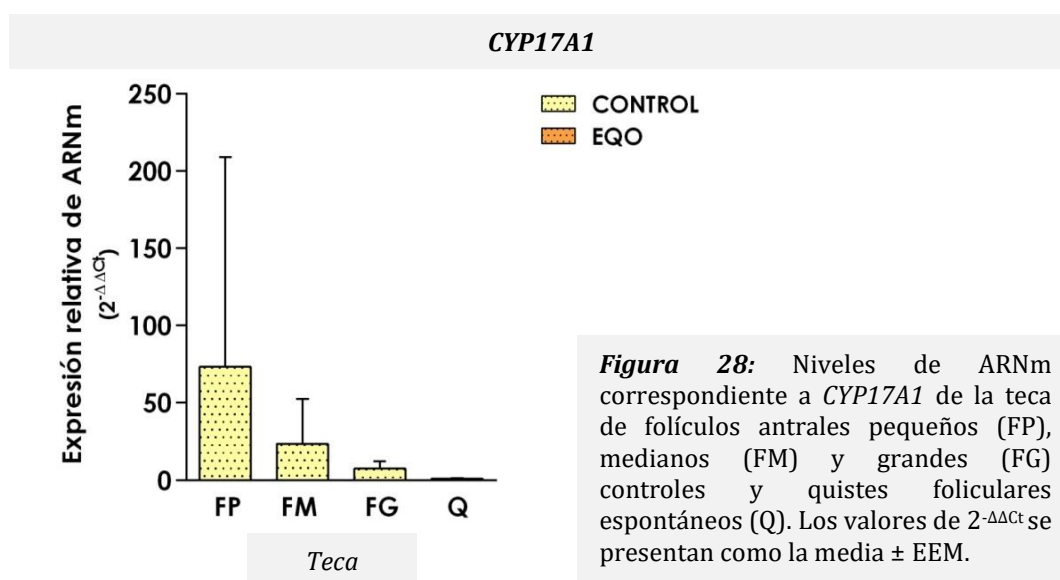
3.3.3.5. Expresión génica de CYP19A1

Se detectó expresión de $CYP19A1$ únicamente en las células de la granulosa. Los niveles de ARNm fueron menores en quistes y folículos pequeños respecto a folículos medianos y grandes ($p < 0,05$) (Figura 27).



3.3.3.6. Expresión génica de *CYP17A1*

Se detectó expresión de *CYP17A1* únicamente en las células teca, con niveles similares en todos los grupos analizados ($p > 0,05$) (Figura 28).



3.3.4. Expresión y localización proteica de p-ERK 1/2, panAkt, p-mTOR

La expresión proteica de p-ERK 1/2, panAkt y p-mTOR, correspondientes a intermediarios en la cascada de señalización de insulina, fue detectada y localizada por

inmunohistoquímica. Los controles negativos no evidenciaron marcación. La corroboración de la especificidad de los anticuerpos usados para inmunohistoquímica se realizó mediante western blot. De esta manera se confirmó que los anticuerpos contra las proteínas evaluadas se unieron a específicamente y no generaron reacciones cruzadas, como se muestra en las Figuras 30, 35 y 40.

3.3.4.1. Expresión proteica y localización de p-ERK 1/2

La expresión de p-ERK1/2 fue localizada en el citoplasma de las células de la granulosa de todos los folículos y grupos analizados. En células de la teca no se detectó marcación (Figuras 30, 31 y 33).

3.3.4.1.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

En el grupo control no se observaron diferencias significativas de expresión en la población de células de la granulosa entre las diferentes categorías foliculares analizadas ($p > 0,05$) (Figura 29 y 30).

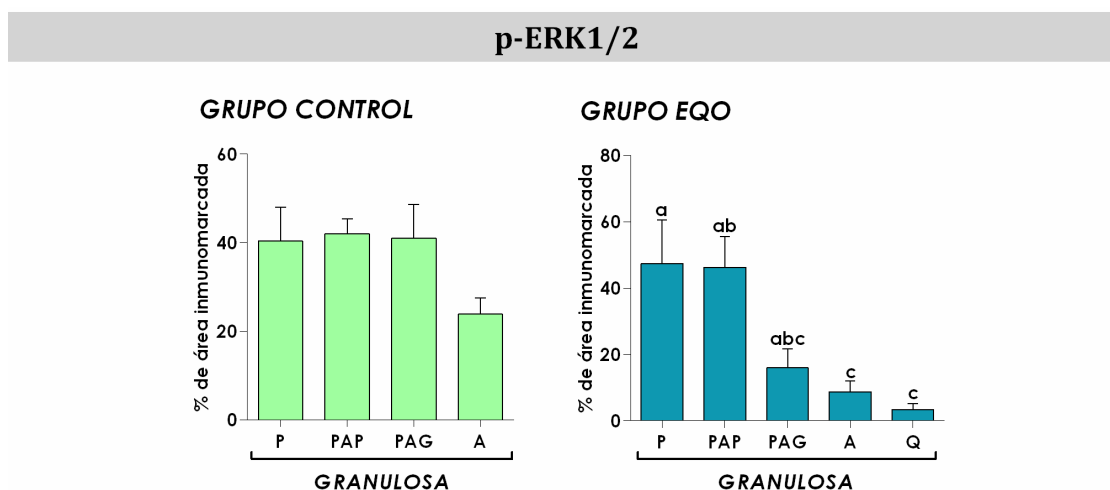
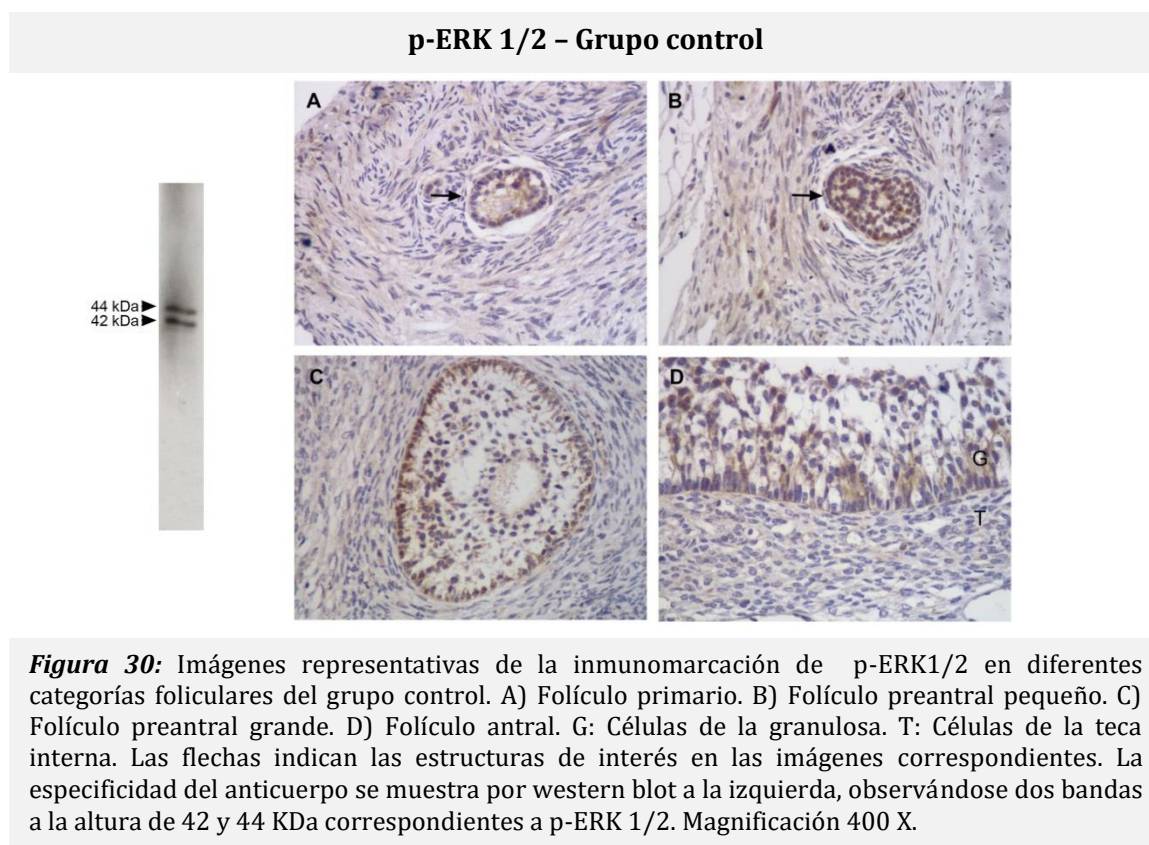
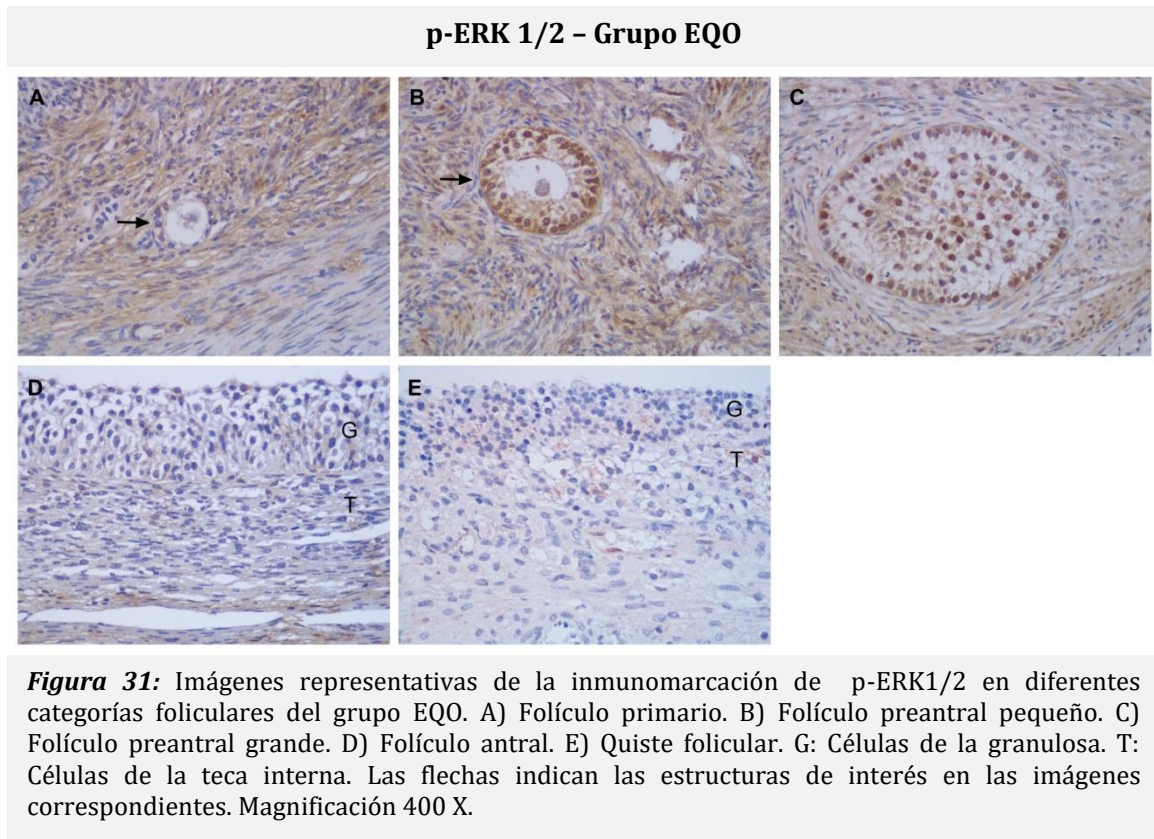


Figura 29: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de p-ERK 1/2 en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).



En la población de células de la granulosa del grupo EQO, se observó una paulatina disminución en la expresión proteica de p-ERK 1/2 a lo largo de la foliculogénesis, existiendo una mayor expresión en folículos primarios y preantrales pequeños respecto a folículos antrales y quísticos ($p < 0,05$) (Figura 29 y 31).



3.3.4.1.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

La expresión de p-ERK 1/2 fue mayor en folículos preantrales grandes y folículos antrales del grupo control, respecto al grupo EQO ($p < 0,05$). Los folículos antrales controles mostraron una mayor marcación en relación a los folículos quísticos ($p < 0,05$) (Figuras 32 y 33).

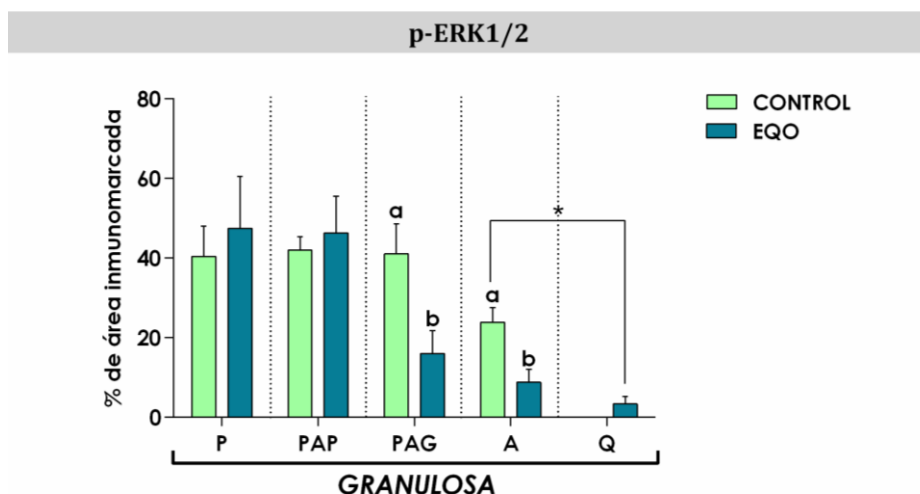


Figura 32: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de p-ERK1/2 en células de la granulosa de cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los folículos antrales del grupo control y los folículos quísticos ($p < 0,05$).

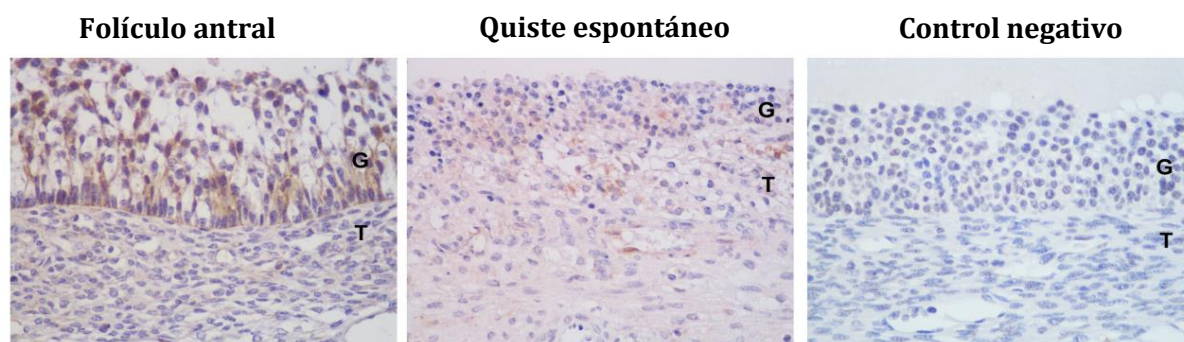


Figura 33: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-ERK1/2 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO). G: Células de la granulosa. T: Células de la teca. El control negativo de inmunohistoquímica se muestra en la imagen de la derecha. Magnificación 400x.

3.3.4.2. Expresión proteica y localización de panAkt

La expresión de panAkt fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y células de la teca de todos los folículos y grupos analizados (Figuras 35, 36 y 38).

3.3.4.2.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

En células de la granulosa del grupo control la expresión de panAkt fue mayor en los folículos primarios y preantrales pequeños en relación a los folículos preantrales grandes y antrales ($p < 0,05$). Además, en las células de teca se observó una menor expresión en folículos preantrales grandes en relación a los folículos antrales ($p < 0,05$) (Figuras 34 y 35).

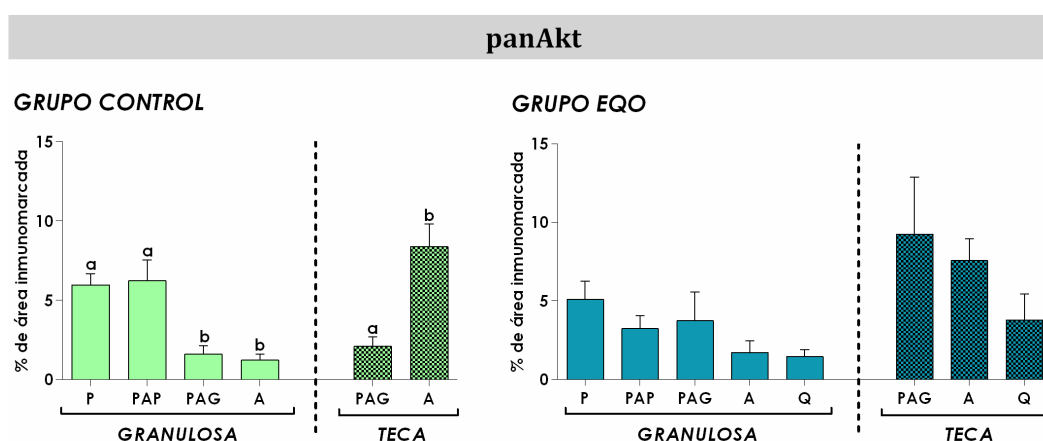


Figura 34: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de panAkt en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo EQO no se determinaron diferencias entre las distintas categorías foliculares durante la foliculogénesis en ninguna de las poblaciones celulares (granulosa y teca interna) ($p > 0,05$) (Figuras 34 y 36).

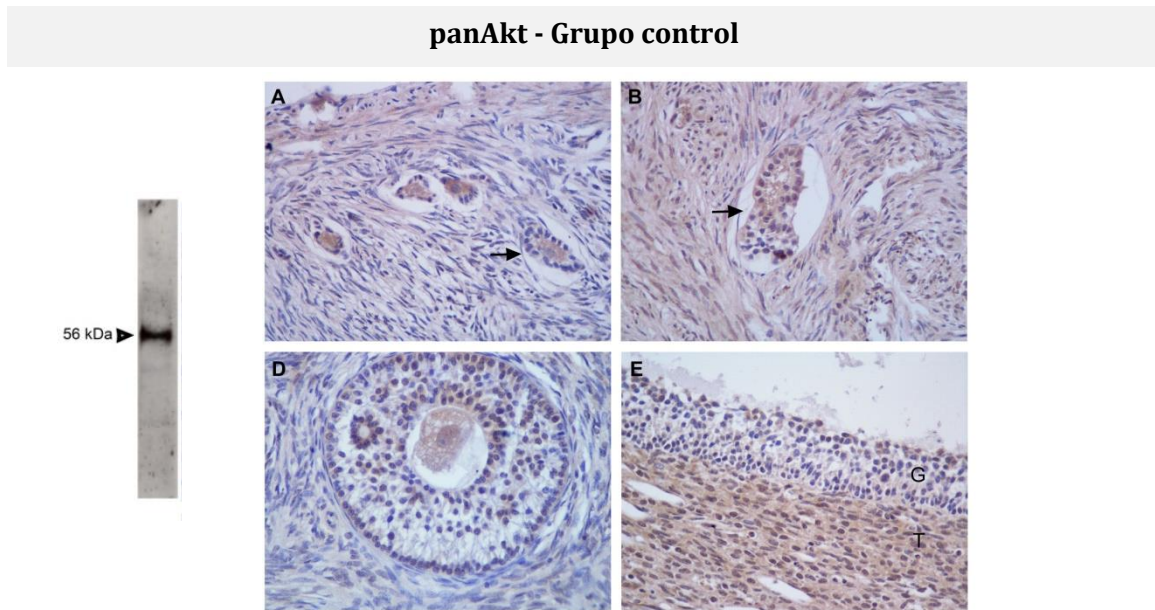


Figura 35: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 56 KDa correspondientes a panAkt. Magnificación 400 X.

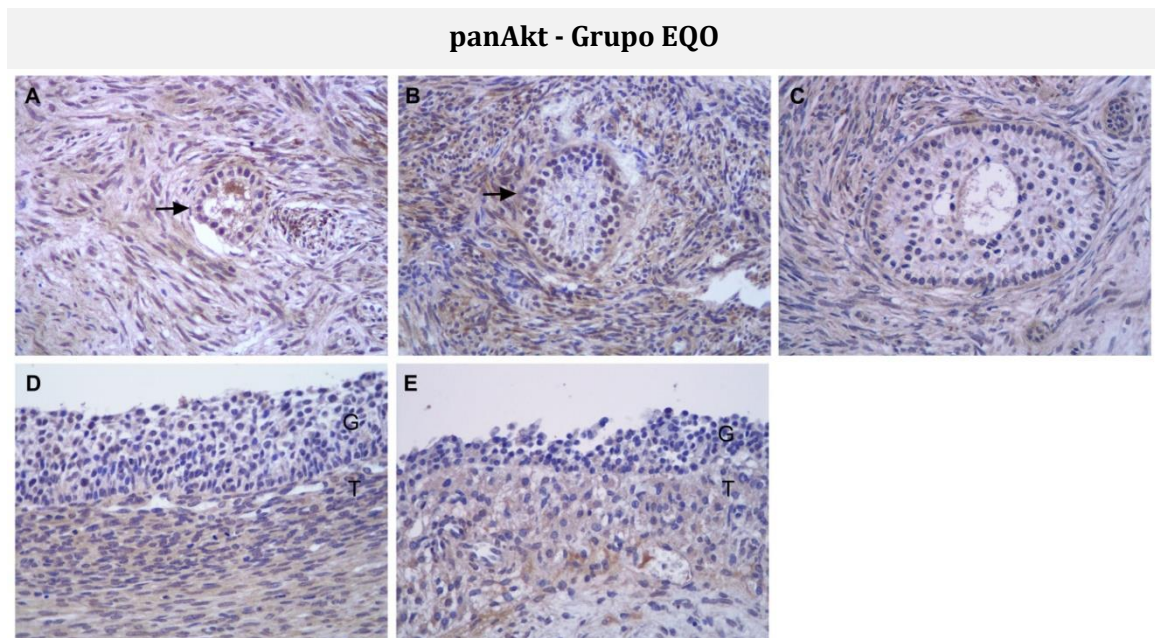


Figura 36: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo EQO. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Quiste folicular. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

3.3.4.2.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

La expresión de panAkt en folículos preantrales grandes fue mayor en el grupo con EQO respecto al grupo control, para ambas poblaciones foliculares ($p < 0,05$). En células de la teca, los folículos antrales controles mostraron una mayor marcación respecto a los folículos quísticos ($p < 0,05$) (Figuras 37 y 38).

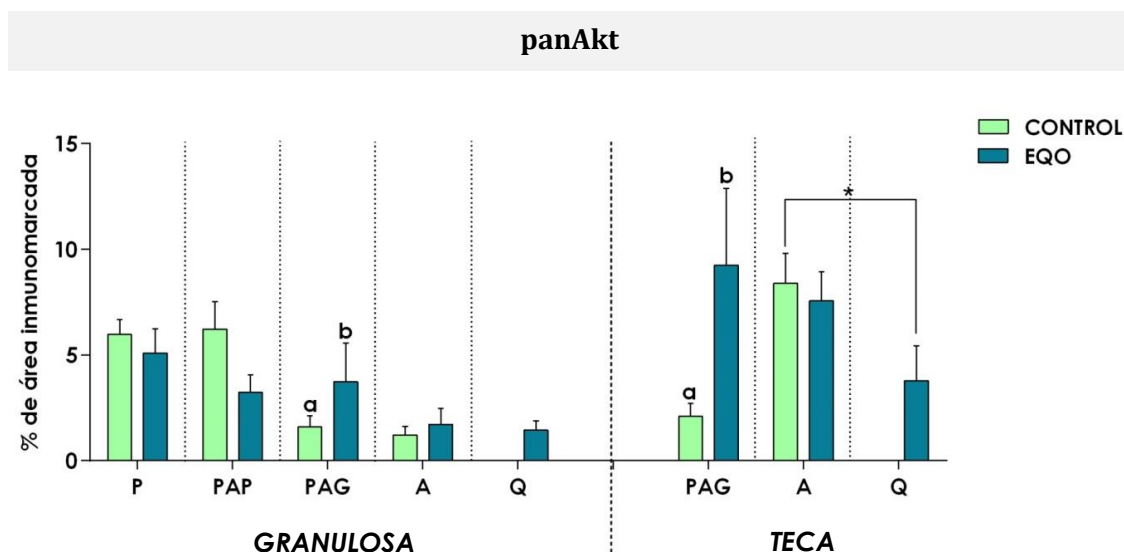


Figura 37: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de Akt en células de la granulosa y de la teca de cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los folículos antrales del grupo control y los folículos quísticos ($p < 0,05$).

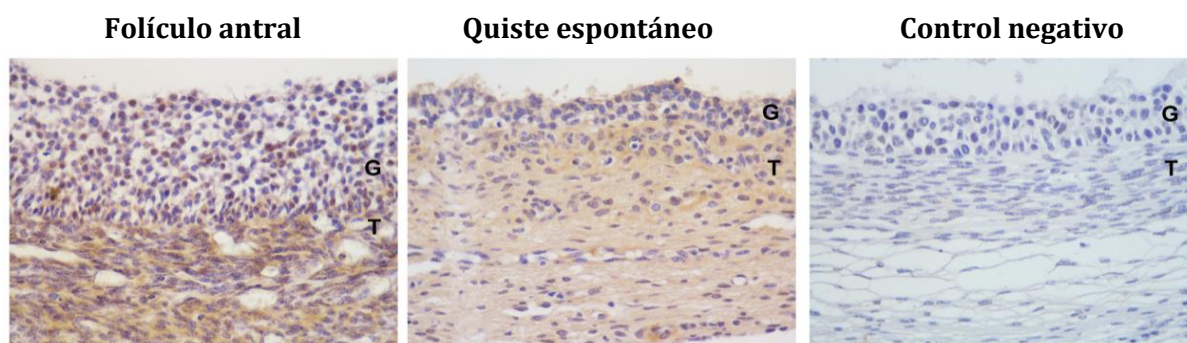


Figura 38: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO). G: Células de la granulosa. T: Células de la teca. El control negativo de inmunohistoquímica se muestra en la imagen de la derecha. Magnificación 400x.

3.3.4.3. Expresión proteica y localización de p-mTOR

La expresión de p-mTOR fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y células de la teca de todos los folículos y grupos analizados (Figuras 40, 41 y 43).

3.3.4.3.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

En células de la granulosa del grupo control la expresión de mTOR fue mayor en los folículos primarios y preantrales pequeños respecto a los folículos preantrales grandes y antrales ($p < 0,05$). En las células de teca, no se determinaron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Figuras 39 y 40).

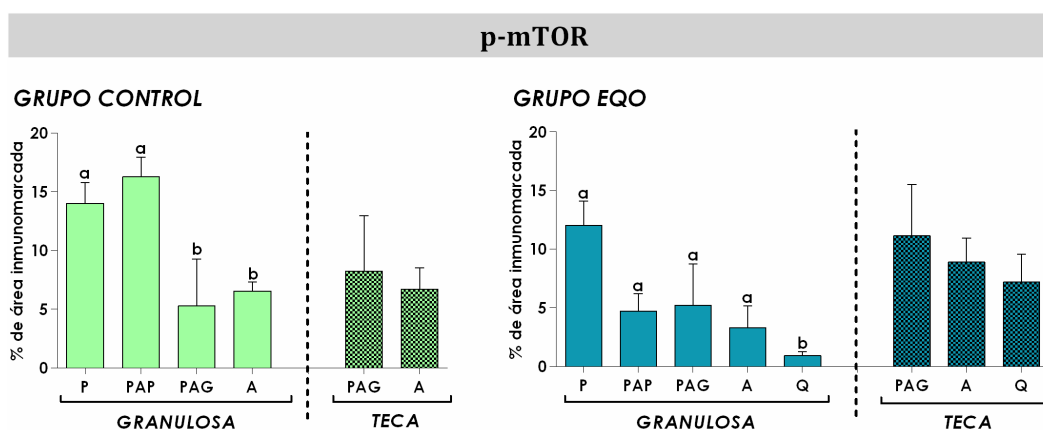


Figura 39: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de p-mTOR en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En las células granulosas del grupo EQO la expresión proteica de mTOR fue mayor en folículos primarios, preantrales y antrales respecto a los folículos quísticos ($p < 0,05$), mientras que en células de la teca no se determinaron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Figuras 39 y 41).

p-mTOR - Grupo control

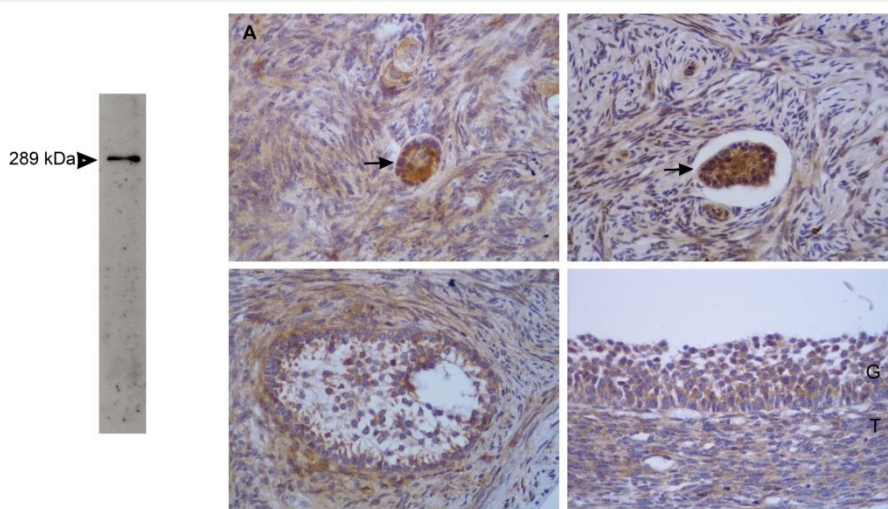


Figura 40: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-mTOR en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 289 KDa correspondientes a p-mTOR. Magnificación 400 X.

p-mTOR - Grupo EQO

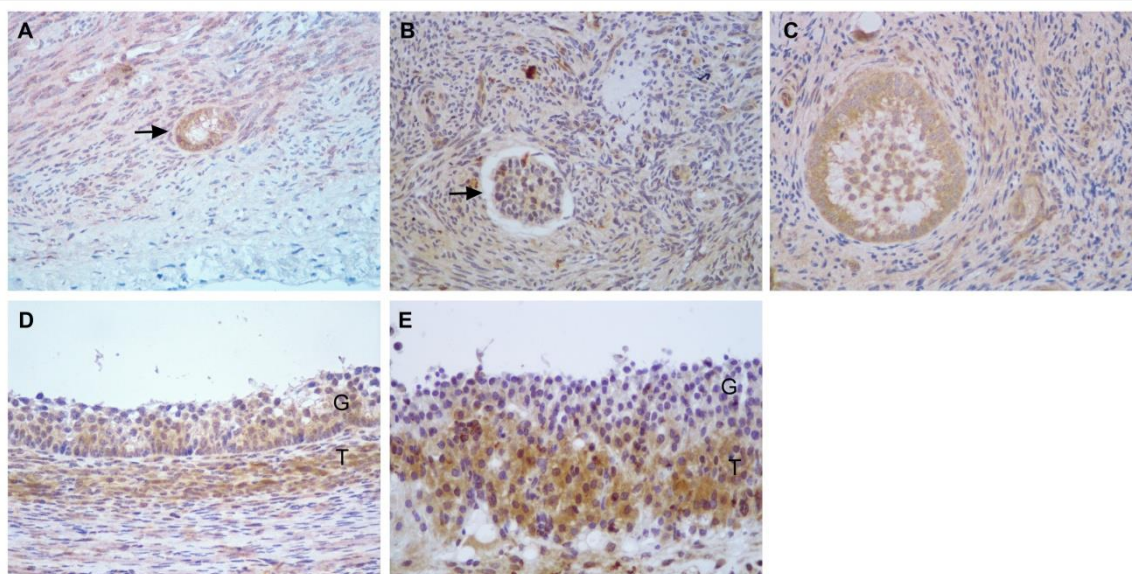


Figura 41: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-mTOR en diferentes categorías foliculares del grupo EQO. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Quiste folicular. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

3.3.4.3.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

En células de la granulosa, la expresión de mTOR en folículos preantrales pequeños fue mayor en el grupo control respecto al grupo con EQO, para ambas poblaciones foliculares ($p < 0,05$). Los folículos antrales controles mostraron una mayor marcación respecto a los folículos quísticos ($p < 0,05$). En células de la teca no se detectaron diferencias entre ambos grupos ($p > 0,05$) (Figuras 42 y 43).

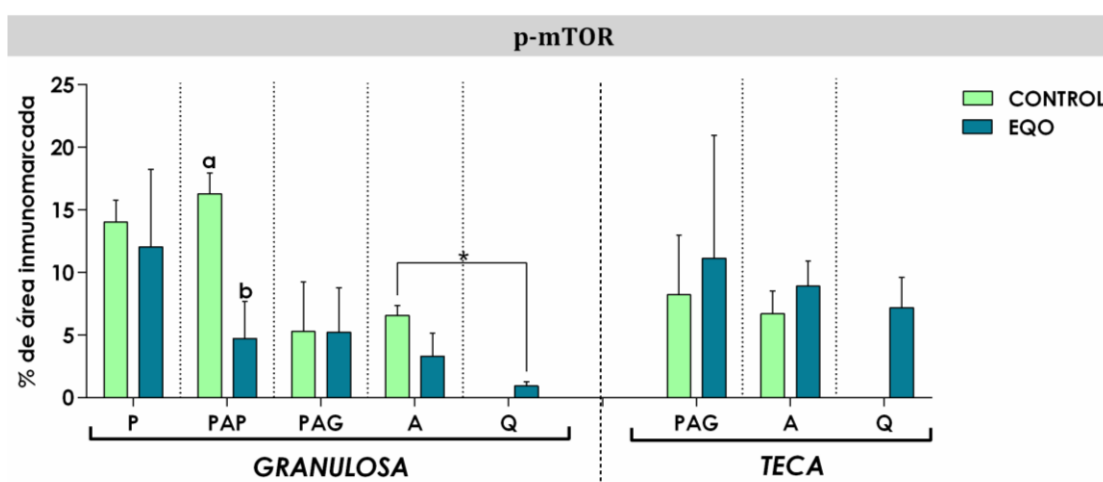


Figura 42: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de mTOR en células de la granulosa y de la teca de cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los folículos antrales del grupo control y los folículos quísticos ($p < 0,05$).

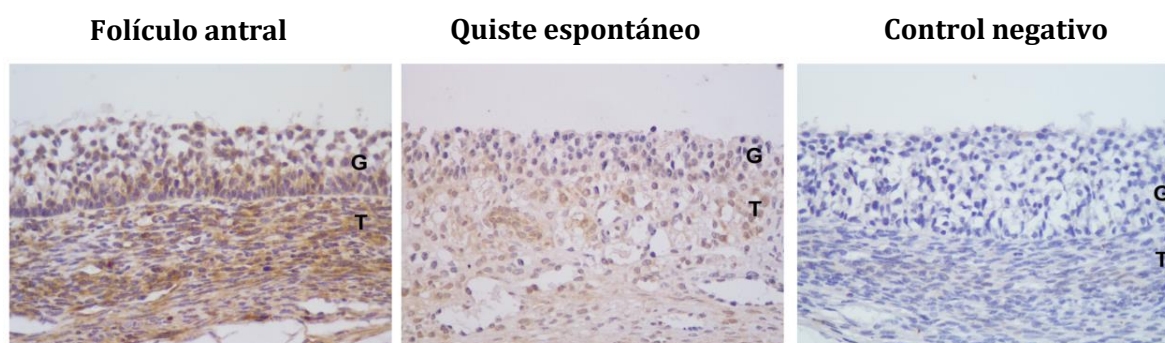


Figura 43: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-mTOR en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO). G: Células de la granulosa. T: Células de la teca. El control negativo de inmunohistoquímica se muestra en la imagen de la derecha. Magnificación 400x.

3.3.5. Expresión y localización proteica de StAR, 3 β -HSD, CYP19A1 y CYP17A1

La expresión proteica de StAR, 3 β -HSD, CYP19A1 y CYP17A1, enzimas intervinientes en la síntesis de esteroides, fue detectada y localizada por inmunohistoquímica. Los controles negativos no evidenciaron marcación. La corroboración de la especificidad de los anticuerpos usados para inmunohistoquímica se realizó mediante western blot. De esta manera se confirmó que los anticuerpos contra las proteínas evaluadas se unieron a específicamente y no generaron reacciones cruzadas, como se muestra en las Figuras 45, 50, 55 y 58.

3.3.5.1. Expresión proteica y localización de StAR

La expresión de StAR fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca de todas las categorías foliculares de ambos grupos (Figuras 45, 46 y 48).

3.3.5.1.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

En las células de la granulosa y de la teca del grupo control, la expresión de StAR fue similar a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figuras 44 y 45).

En las células de la granulosa del grupo EQO se determinó una mayor expresión de StAR en los folículos primarios y preantrales pequeños respecto a las demás categorías ($p < 0,05$). En las células de la teca la expresión proteica fue mayor en folículos antrales y quísticos, respecto a los folículos preantrales grandes ($p < 0,05$) (Figuras 44 y 46).

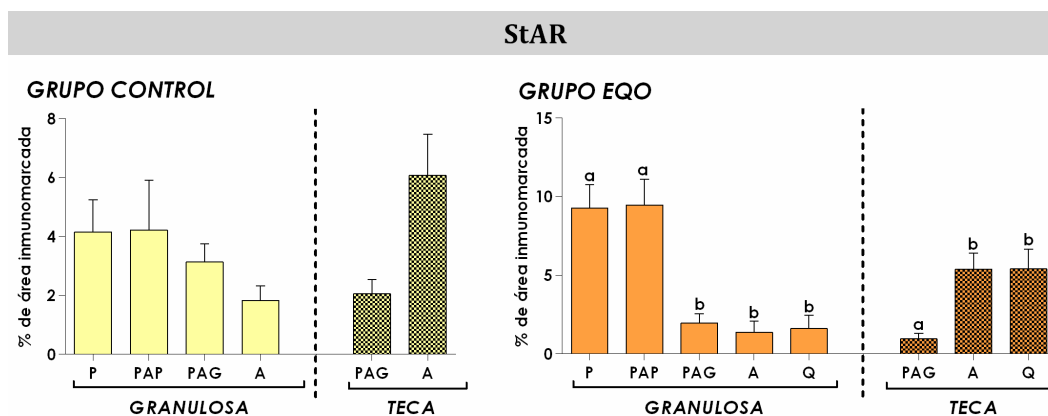


Figura 44: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de StAR en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

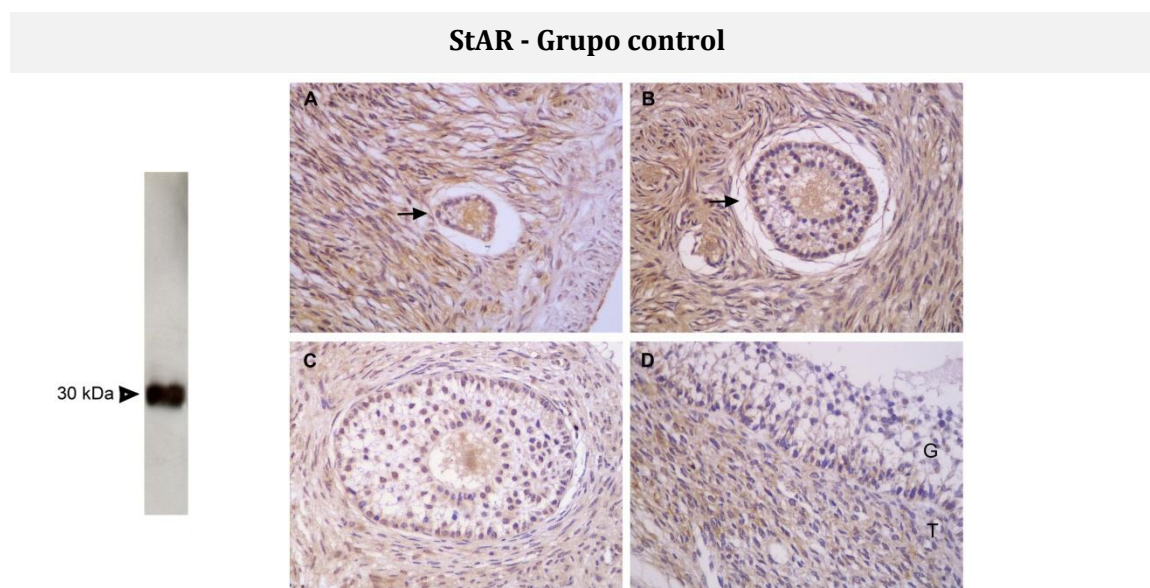


Figura 45: Imágenes representativas de la inmunomarcación de StAR en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 30 KDa correspondientes a StAR. Magnificación 400 X.

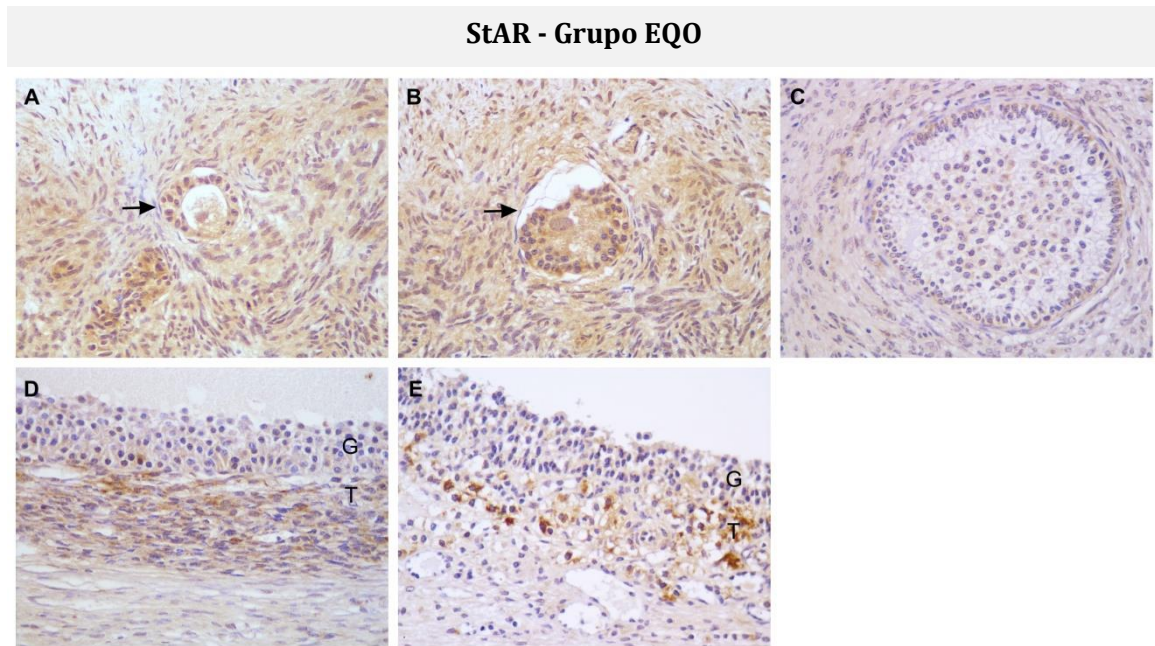


Figura 46: Imágenes representativas de la inmunomarcación de StAR en diferentes categorías foliculares del grupo EQO. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Quiste folicular. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

3.3.5.1.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

En células de la granulosa, la expresión de StAR en folículos primarios fue mayor en el grupo EQO respecto al grupo control ($p < 0,05$), mientras que en células de la teca no se observaron diferencias entre ambos grupos ($p > 0,05$) (Figuras 47 y 48).

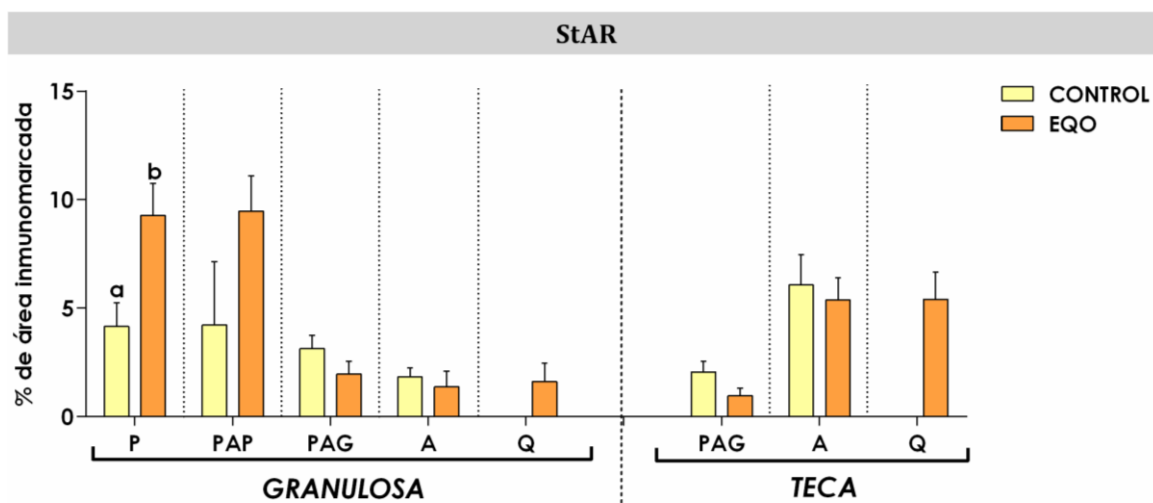


Figura 47: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de StAR en células de la granulosa y de la teca de cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

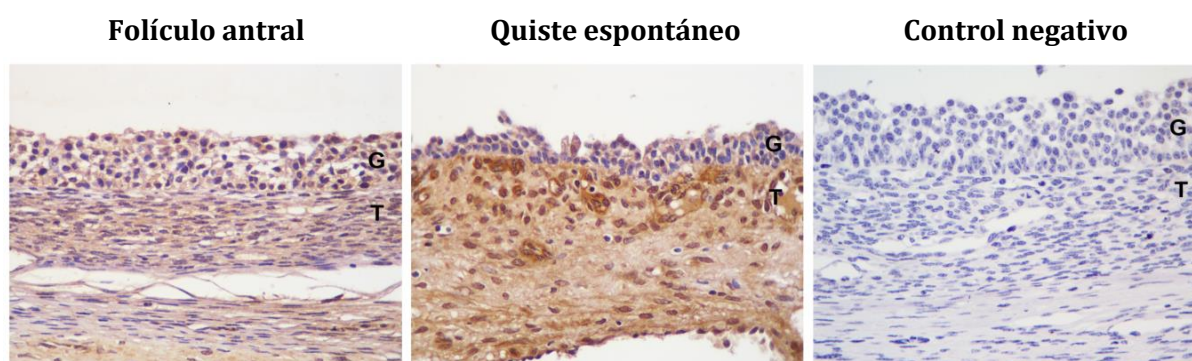


Figura 48: Imágenes representativas de la inmunomarcación de StAR en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO). G: Células de la granulosa. T: Células de la teca. El control negativo de inmunohistoquímica se muestra en la imagen de la derecha. Magnificación 400x.

3.3.5.2. Expresión proteica y localización de 3β -HSD

La expresión de 3β -HSD fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca de todas las categorías foliculares de ambos grupos (Figuras 50, 51 y 53).

3.3.5.2.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

Tanto en el grupo control como en el grupo EQO no se evidenciaron diferencias entre las categorías foliculares en ninguna de las poblaciones celulares analizadas ($p > 0,05$) (Figuras 49 y 50).

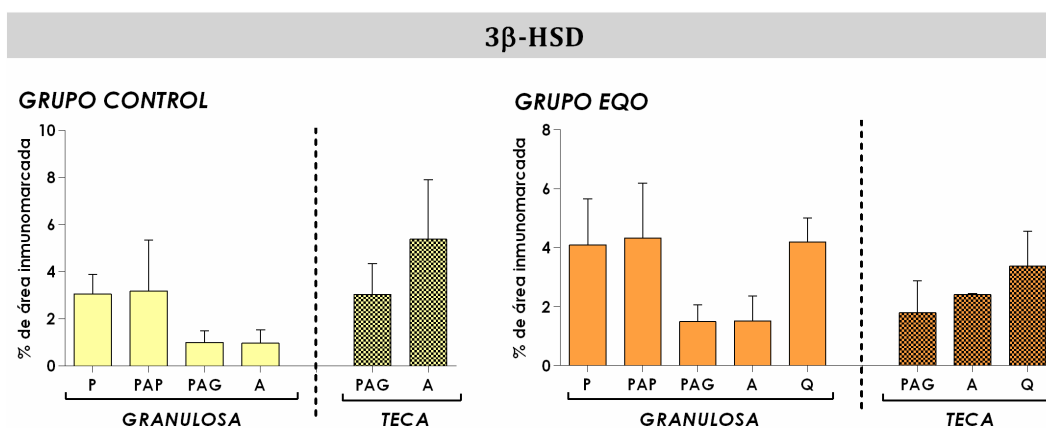


Figura 49: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de 3 β -HSD en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM.

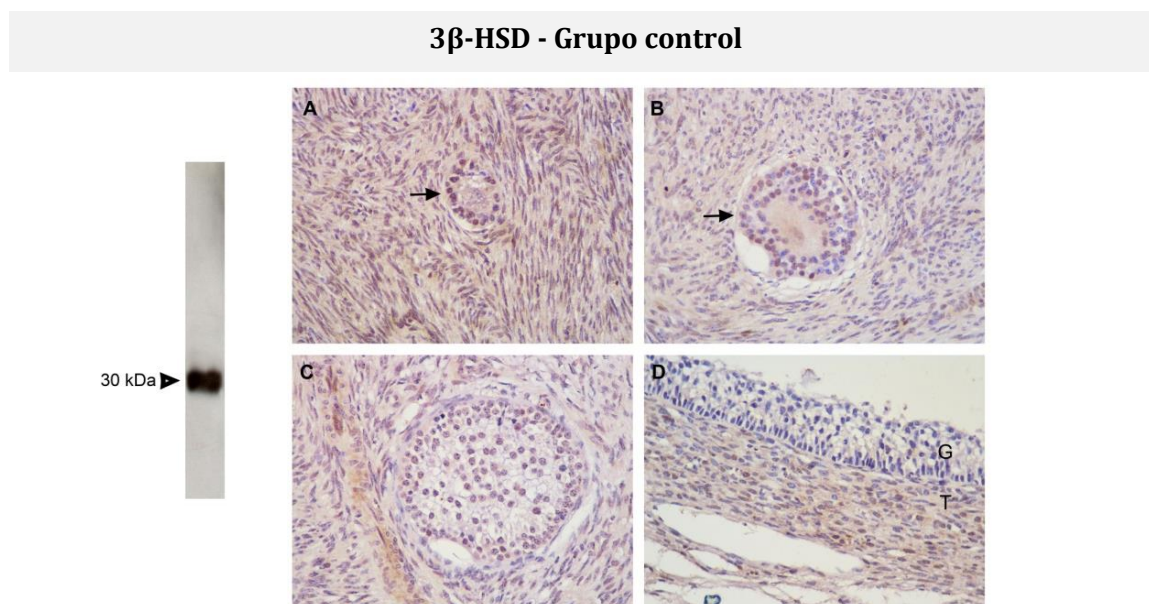
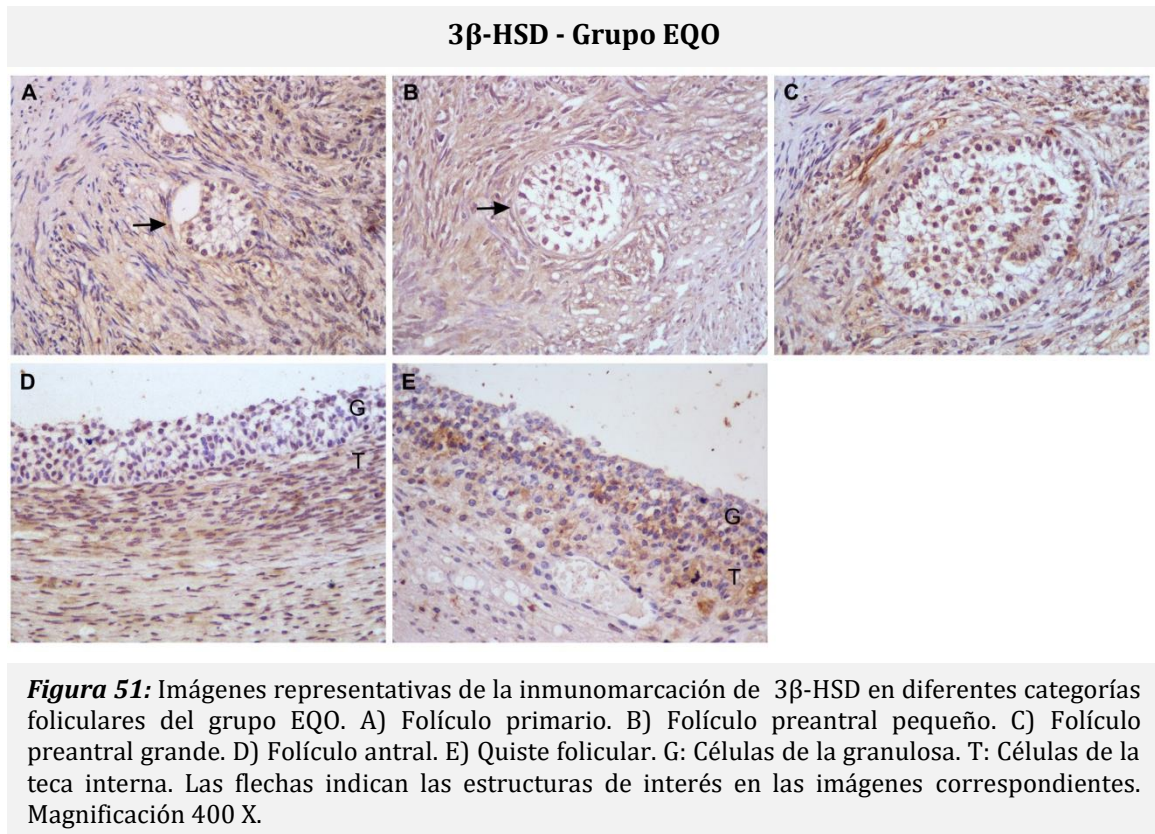


Figura 50: Imágenes representativas de la inmunomarcación de 3 β -HSD en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 30 KDa correspondientes a 3 β -HSD. Magnificación 400 X.



3.3.5.2.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

En células de la granulosa, los folículos antrales controles mostraron una menor marcación respecto a los folículos quísticos ($p < 0,05$), mientras que en las células de la teca no se observaron diferencias entre ambos grupos ($p > 0,05$) (Figuras 52 y 53).

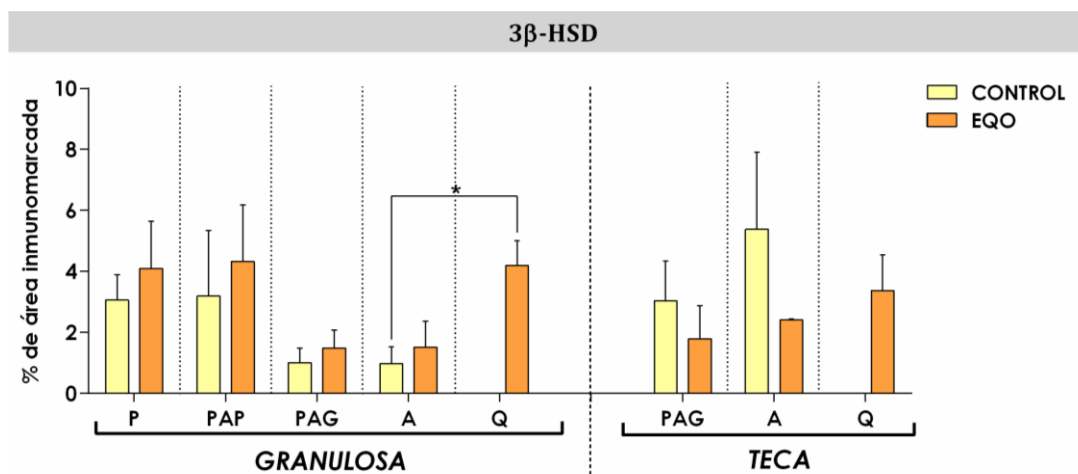


Figura 52: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de 3β-HSD en células de la granulosa y de la teca de cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio. Los valores representan la media ± EEM. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los folículos antrales del grupo control y los folículos quísticos ($p < 0,05$).

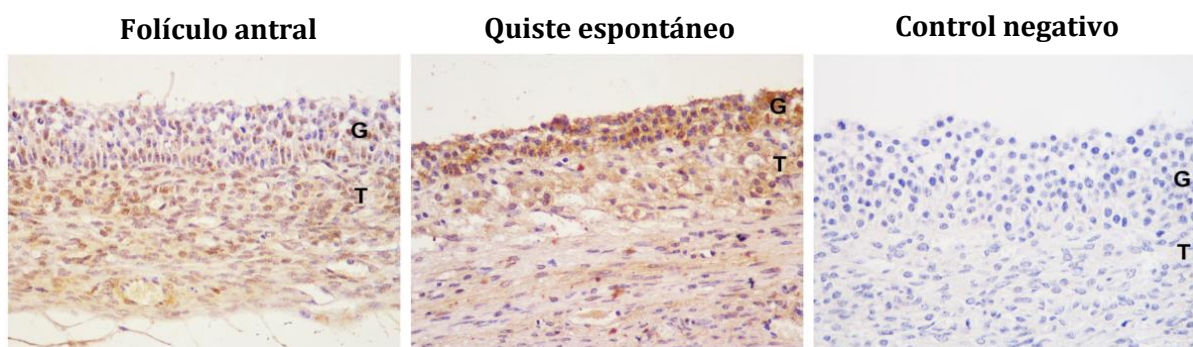


Figura 53: Imágenes representativas de la inmunomarcación de 3β-HSD en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO). G: Células de la granulosa. T: Células de la teca. El control negativo de inmunohistoquímica se muestra en la imagen de la derecha. Magnificación 400x.

3.3.5.3. Expresión proteica y localización de CYP19A1 y CYP17A1

La expresión de CYP19A1 fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa de todas las categorías foliculares de ambos grupos (Figuras 55, 56 y 61).

En el grupo control, no se detectaron diferencias en la expresión proteica de CYP19A1 en las células de la granulosa a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figuras 54 y 55).

La expresión de CYP17A1 fue localizado por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la teca de folículos antrales de ambos grupos y además, en folículos quísticos del grupo EQO. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$) (Figuras 58, 59 y 63).

3.3.5.3.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

En las células de la granulosa, la expresión de CYP19A1 fue mayor en los folículos quísticos del grupo EQO respecto a las demás categorías foliculares ($p < 0,05$) (Figuras 54 y 56).

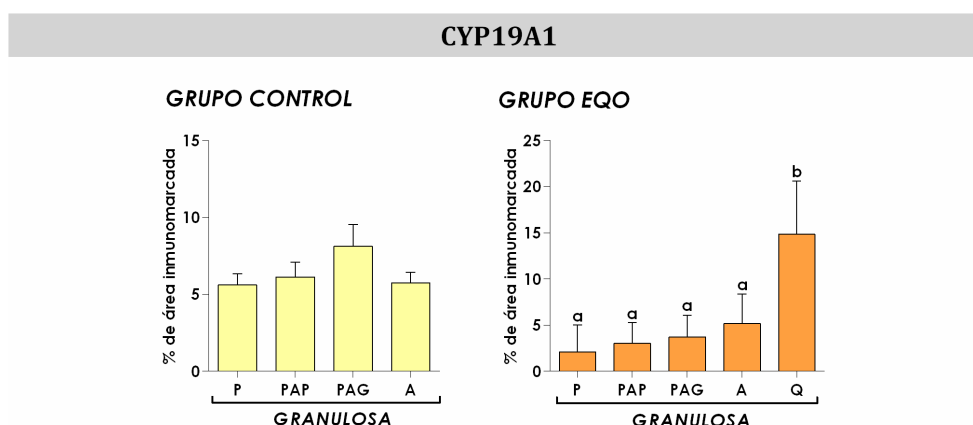


Figura 54: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de CYP19A1 en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo control, sólo se registró expresión proteica de CYP17A1 en las células de la teca de los folículos antrales, por lo que no se realizó análisis estadístico (Figura 58).

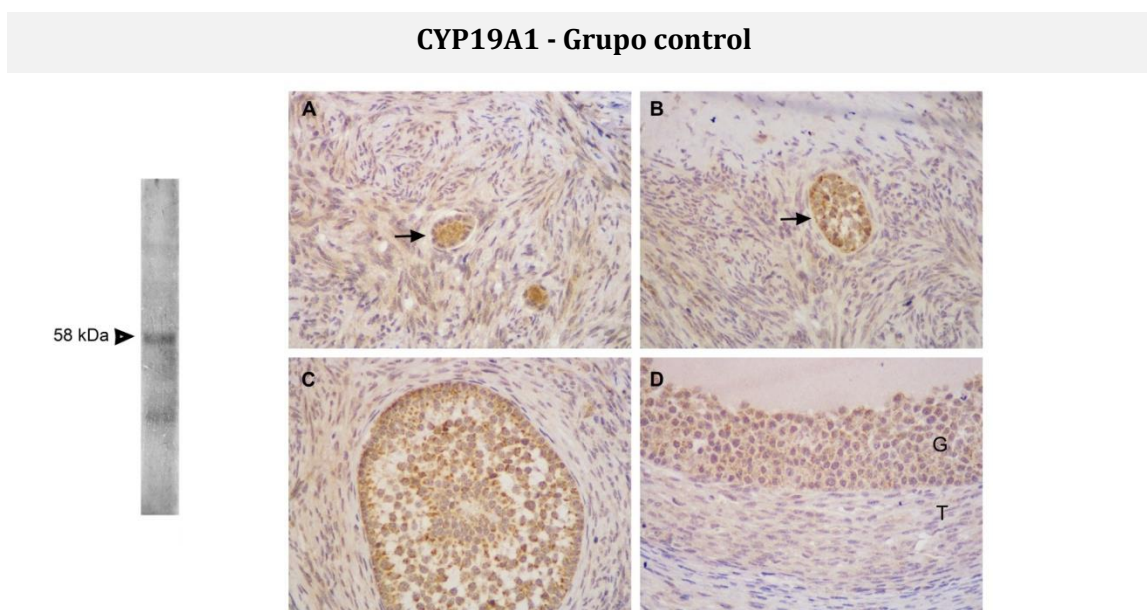


Figura 55: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CYP19A1 en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 58 KDa correspondientes a CYP19A1. Magnificación 400 X.

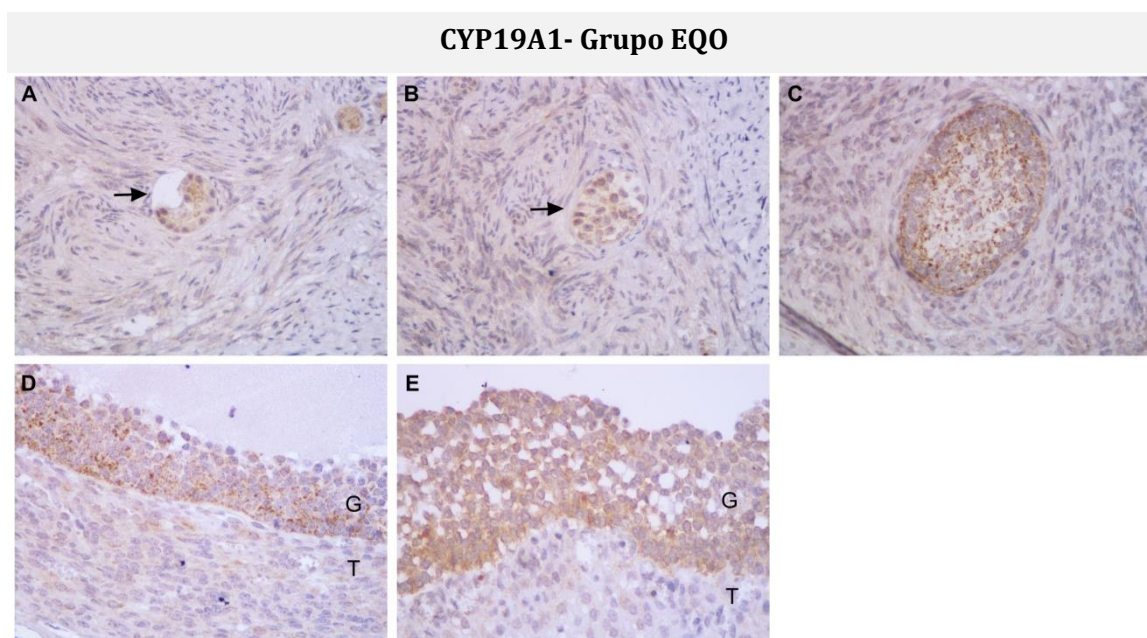
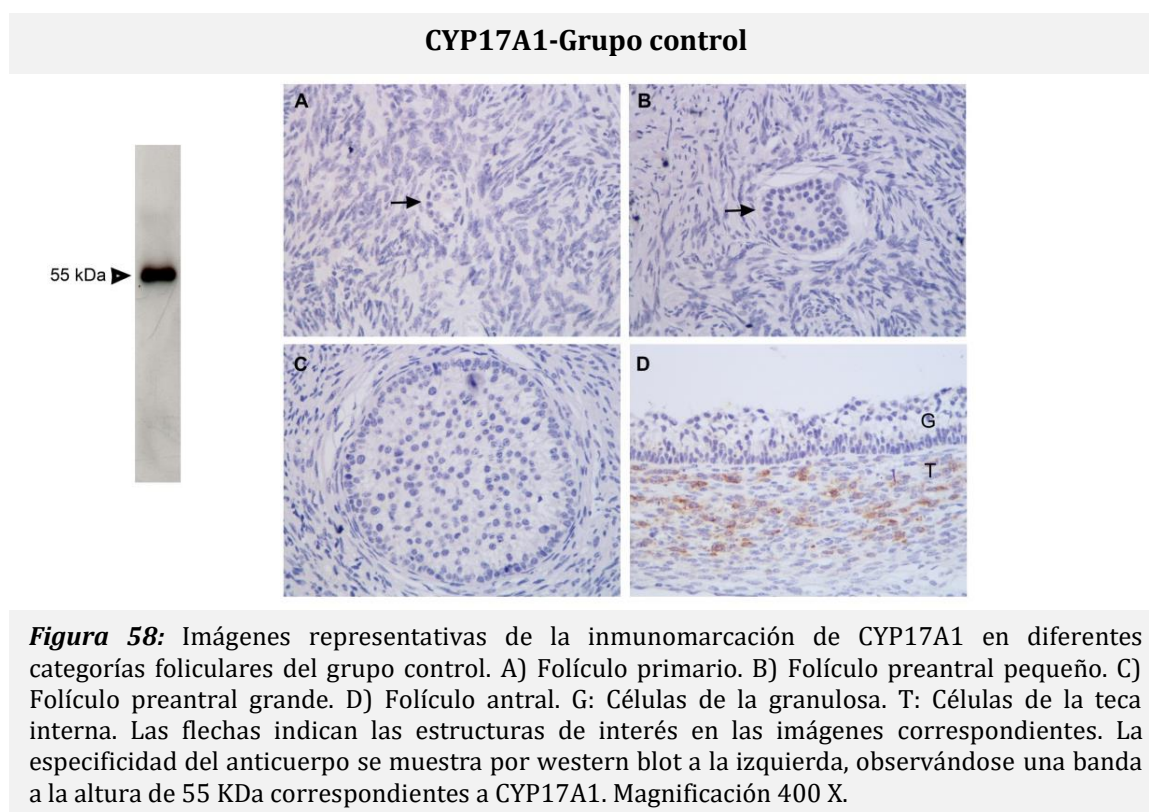
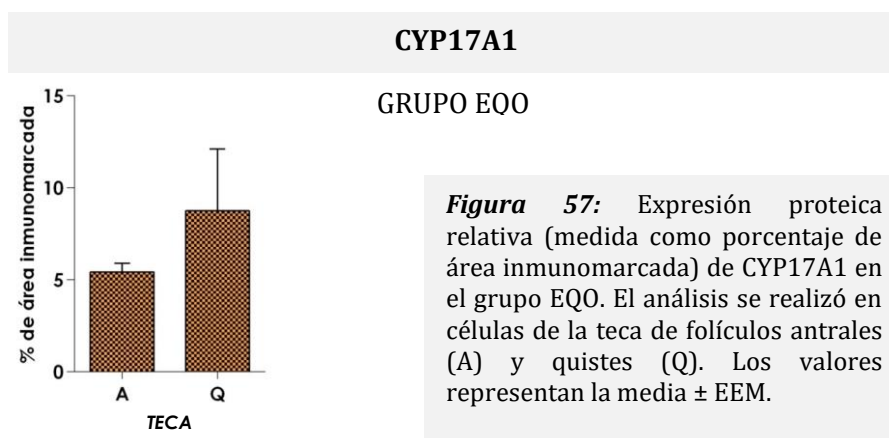


Figura 56: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CYP19A1 en diferentes categorías foliculares del grupo EQO. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Quiste folicular. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

En el grupo EQO, se detectó expresión proteica de CYP17A1 en células de la teca de los folículos antrales y quísticos, sin registrarse diferencias entre ambas categorías foliculares ($p > 0,05$) (Figura 57 y 59).



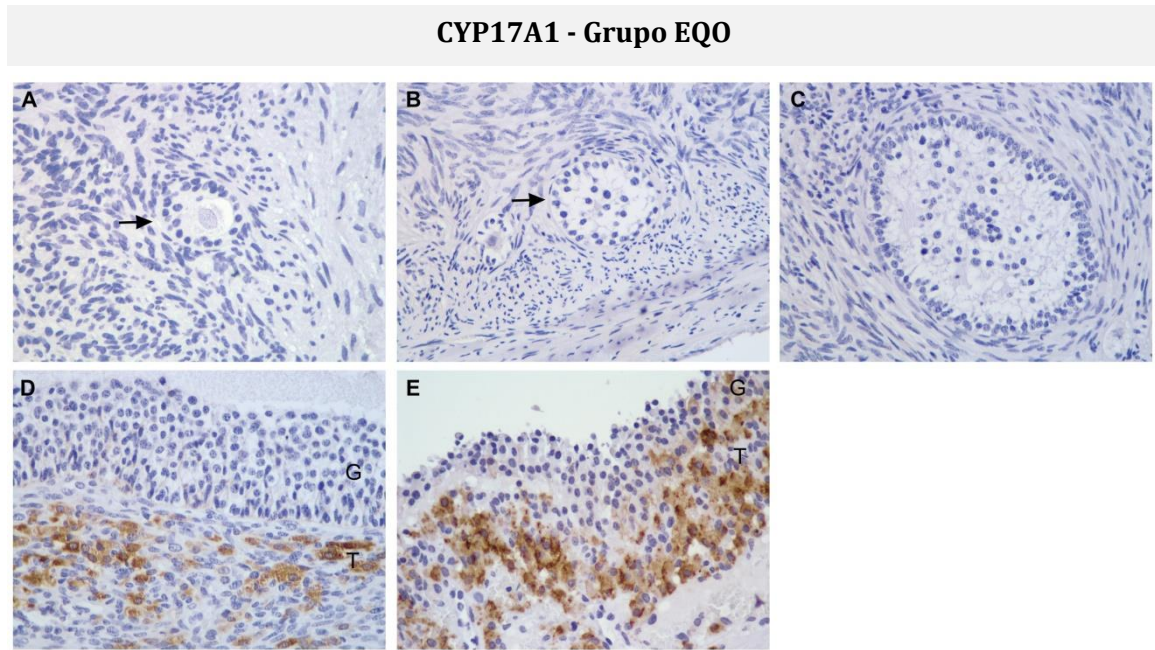


Figura 59: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CYP17A1 en diferentes categorías foliculares del grupo EQO. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Quiste folicular. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

3.3.5.3.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

La expresión proteica de CYP19A1 fue mayor en folículos quísticos respecto a folículos antrales del grupo control ($p < 0,05$) (Figuras 60 y 61).

La expresión proteica de CYP17A1 fue similar entre ambos grupos ($p > 0,05$) (Figuras 62 y 63).

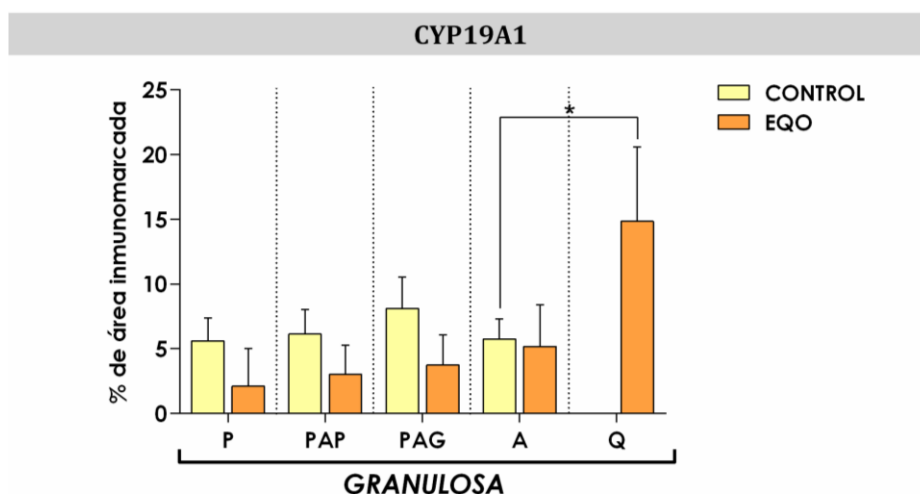


Figura 60: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de CYP19A1 en células de la granulosa de cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio. Los valores representan la media \pm EEM. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los folículos antrales del grupo control y los folículos quísticos ($p < 0,05$).

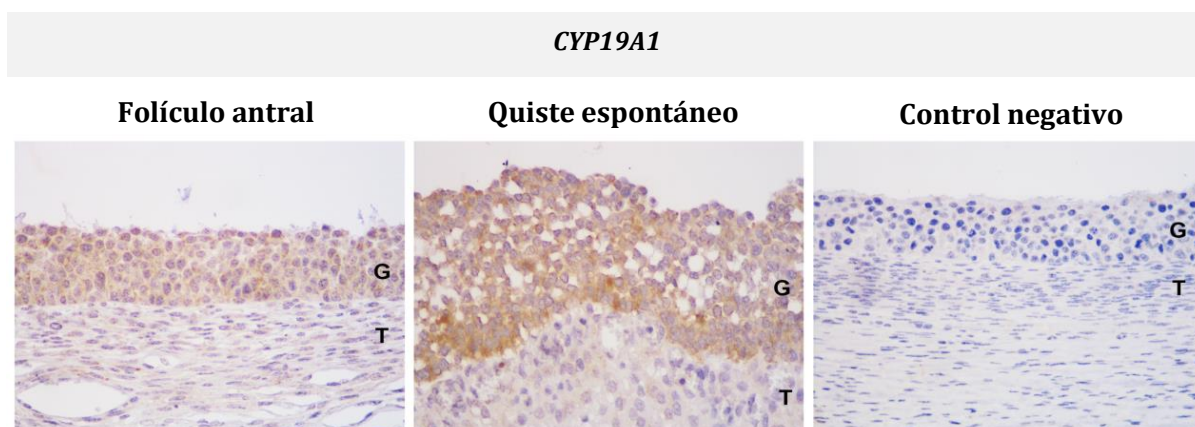


Figura 61: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CYP19A1 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO). G: Células de la granulosa. T: Células de la teca. El control negativo de inmunohistoquímica se muestra en la imagen de la derecha. Magnificación 400x.

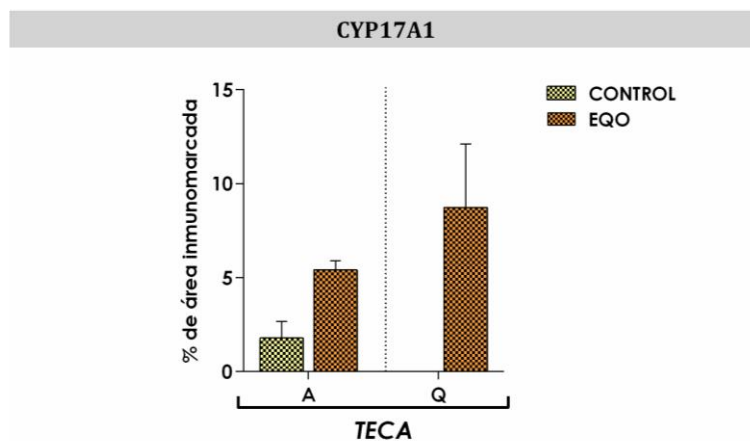


Figura 62: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de CYP17A1 en células de la teca cada categoría folicular entre los distintos grupos en estudio. Los valores representan la media \pm EEM.

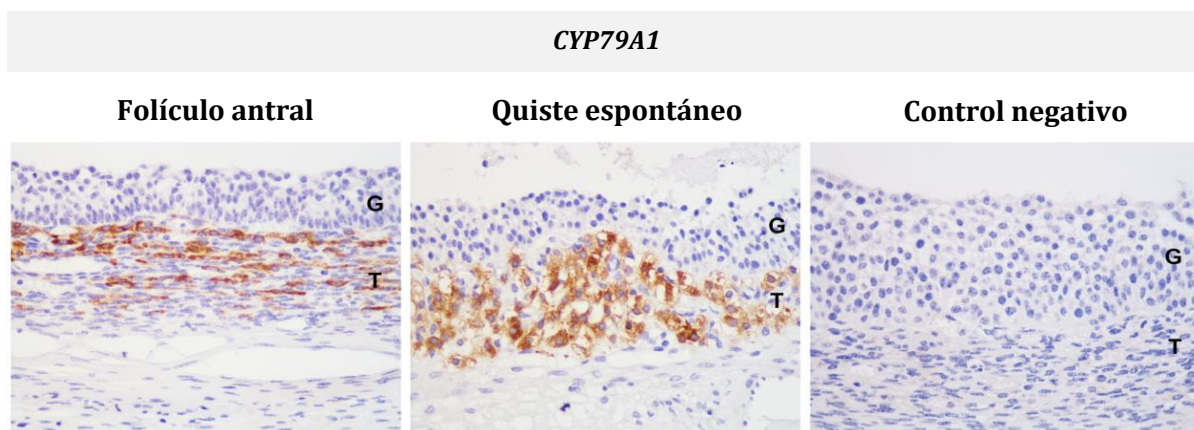


Figura 63: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-ERK1/2 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO). G: Células de la granulosa. T: Células de la teca. El control negativo de inmunohistoquímica se muestra en la imagen de la derecha. Magnificación 400x.

3.4. CAPÍTULO I:

Discusión

3.4.1. Cascada de señalización de insulina y su implicancia en vacas con EQO

La EQO es una enfermedad multifactorial y para comprender su patogenia es necesario el estudio integral de las alteraciones en las señales endocrinas a través de las gonadotrofinas y en las señales paracrinas y autocrinas a través de los esteroides (Vanholder y col., 2006; Ortega y col., 2015).

Numerosas investigaciones han demostrado que la insulina tiene diversas acciones sobre el ovario, incluida la esteroidogénesis, el crecimiento de las células de la granulosa y la teca (Spicer y col., 2002; Bossaert y col., 2010), la maduración folicular (Landau y col., 2000; Kawashima y col., 2007) y la función ovárica posparto normal (Miyoshi y col., 2001). Además, alteraciones en las concentraciones de insulina pueden afectar el desarrollo y la maduración de los folículos y la respuesta a la LH, pudiendo conducir a la anovulación y a la formación de quistes (Vanholder y col., 2005a).

En este capítulo presentamos los resultados de la evaluación de las concentraciones intrafoliculares y séricas de insulina en animales sanos y con EQO, observando una menor concentración sérica de insulina en vacas con la enfermedad y sin detectar diferencias a nivel del líquido folicular. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Vanholder y col. (2005a) quienes sugieren que la formación de quistes ováricos se asocia con niveles bajos de insulina circulante. En coincidencia con los resultados aquí presentados, Hein y col. (2015) detectaron menores concentraciones séricas de insulina en vacas con EQO y además, una menor expresión de componentes iniciales de la cascada de señalización de insulina en ovarios quísticos, como son IR y PI3K, que indicarían que las alteraciones en esta vía comienza desde su receptor, pudiendo influir directamente en la funcionalidad ovárica.

La vía PI3K/Akt se ha identificado como una de las principales vías reguladoras, no gonadotróficas, de la diferenciación y el crecimiento folicular (Zheng y col., 2012; Dupont y Scaramuzzi, 2016). Corriente abajo de PI3K, Akt luego de su activación, fosforila diversas quinasas y factores de transcripción implicados en los principales efectos metabólicos de la insulina. Entre estos efectos metabólicos se encuentran la síntesis de proteínas a través de mTOR, la estimulación del crecimiento y la diferenciación celular, y los efectos antiapoptóticos mediante la fosforilación de Bad, todos estos desempeñan papeles determinantes en la funcionalidad ovárica.

La expresión proteica de panAkt y mTOR, a lo largo de la foliculogénesis, en células de la granulosa fue mayor en folículos primarios y preantrales pequeños respecto a las demás categorías en el grupo control. Esto puede explicarse por la gran importancia que tienen estas moléculas en la promoción del desarrollo de los folículos, la proliferación y supervivencia celular, encontrándose presentes desde los estadios de folículo primordial (Cecconi y col., 2012; Dupont y col., 2012; Cheng y col., 2015; Dupont y Scaramuzzi, 2016).

Si bien los niveles de expresión génica de Akt y mTOR fueron similares en folículos de vacas controles y con EQO, se detectaron diferencias significativas en la expresión proteica. En las células de teca, la expresión proteica de Akt fue menor en los quistes que en los folículos antrales del grupo control, lo que concuerda con resultados previos de nuestro grupo que muestran un patrón similar para PI3K (Hein y col., 2015), intermediario de señalización corriente arriba de Akt.

Akt fosforila diversos sustratos, entre ellos se encuentra TSC2, al cual fosforila e inactiva, y de esta forma activa el complejo mTOR, involucrado en la síntesis proteica. Se ha sugerido que Akt está involucrado en la activación de mTOR inducida por LH en células de la granulosa bovina (da Rosa y col., 2016). En los resultados presentados, la expresión de Akt total no se modificó en las células de la granulosa, mientras que la expresión de mTOR fosforilada fue menor en las células de la granulosa de los quistes que en las de los folículos antrales del grupo control.

Aunque se ha sugerido que la actividad de mTOR no es esencial para la ovulación en el ganado (da Rosa y col., 2016), dicho intermediario está involucrado en otros procesos asociados con la función ovárica como ser la proliferación de células de la teca (Palaniappan y col., 2013), la activación de los folículos primordiales y el crecimiento de los folículos preantrales (Cheng y col., 2015).

Como se describió previamente, la activación de la vía PI3K/Akt conduce a las células a través de diversas funciones biológicas (Marino y col., 2003; Fukuda y col., 2009). Se ha demostrado que en el ovario, la FSH y varios factores de crecimiento activan la vía PI3K/Akt en células de la granulosa y folículos cultivados (Hu y col., 2004; Carletti y Christenson, 2009). Asimismo, se ha reportado que en cultivos de células de la teca bovinas, la LH estimula la fosforilación y activación de Akt y que la activación de PI3K/Akt está implicada en la expresión génica de *CYP17A1* y en la producción de andrógenos (Fukuda y col., 2009). Wang y col. (Wang y col., 2018) reportaron que en

cabras la LH aumenta la producción de androstenediona y la abundancia relativa del ARNm de CYP17A1 en las células de la teca mediante la activación de la vía PI3K/Akt, además, por esta misma vía, la LH regularía la apoptosis.

3.4.2. Relación entre las alteraciones en la cascada de insulina con la esteroidogénesis

En el ovario la insulina actúa ejerciendo efectos directos e indirectos sobre la esteroidogénesis y el crecimiento de las células de la granulosa y de la teca, como ha sido demostrado tanto *in vitro* (Spicer y col., 2002) como *in vivo* (Bossaert y col., 2010).

La insulina puede activar la ruta de la MAPK a través de IRS o la fosforilación en tirosina de Shc, estimulando la actividad de MAPK-ERK1/2. Es así que ERK1 y ERK2 se activan con la consiguiente estimulación de la síntesis proteica y finalmente la proliferación celular, diferenciación (Mebratu y Tesfaigzi, 2009) y modulación de la esteroidogénesis a través de la captación de glucosa (Scaramuzzi y col., 2015). Ryan y col. (2008) utilizando inhibidores específicos *in vivo* de Akt y ERK, determinaron una inhibición del crecimiento folicular y una disminución de las concentraciones de 17 β -estradiol en líquido folicular en ovejas.

La activación de ERK sería necesaria para la reanudación de la meiosis en los ovocitos, la ovulación y la luteinización folicular. Esta activación sería inducida por el pico de LH (Fan y col., 2009; Sayasith y Sirois, 2015).

En los resultados presentados en el presente capítulo, hemos detectado una reducción significativa en la expresión de ERK 1/2 en las células de la granulosa de los quistes en comparación con la de los folículos antrales del grupo control. Sin embargo, la expresión de las proteínas relacionadas con la esteroidogénesis evaluadas no se modificaron (StAR y CYP17A1) o incluso aumentaron (CYP19A1 y 3 β -HSD). Esto podría sugerir que las moléculas intermedias de señalización de insulina estudiadas podrían estar ejerciendo su modulación a nivel de la transcripción génica o divergir a otras vías.

Tanto LH como FSH son reguladoras de la foliculogénesis y podrían modularse por varios factores externos, tales como insulina y a la inversa, es decir, la modulación de la acción de la insulina por las gonadotrofinas, también es posible. En las células de la granulosa, la señalización de la insulina a través de Akt1 y FOXO1 es capaz de potenciar la esteroidogénesis estimulada por FSH (da Rosa y col., 2016). En el presente estudio, si

bien la expresión de Akt fue similar en células de la granulosa de folículos antrales y quísticos, se detectó un aumento en la expresión de CYP19A1 en los quistes. Esto podría estar relacionado con los altos niveles de 17β -estradiol previamente detectados en estas estructuras en estudios *in vitro* (Amweg y col., 2013) o durante las primeras etapas de persistencia (Díaz y col., 2015). Sin embargo, en el presente estudio, las vacas con quistes espontáneos presentaron niveles de 17β -estradiol similares a los de las vacas control, de acuerdo con folículos con varios días de persistencia (Díaz y col., 2015).

Las diferencias en la expresión de CYP19A1 y los niveles de 17β -estradiol podrían estar relacionadas con las diferencias en la actividad de CYP19A1 más que con sus niveles de expresión. Sin embargo, se ha documentado que los quistes de reciente formación exhiben concentraciones intrafoliculares mayores de 17β -estradiol, sin diferencias asociadas en la expresión del ARNm de CYP19A1 y StAR en células de la granulosa (Monniaux y col., 2008).

Otros autores han propuesto que ERK podría estar involucrado como un regulador negativo de la expresión de CYP19A1 en células de la granulosa de ratón (Andric y col., 2010), lo que podría respaldar nuestros resultados. Es importante señalar que *CYP19A1* es uno de los muchos genes presentes en el ovario que están regulados negativamente por la LH en forma dependiente de ERK (Fan y col., 2009; Andric y col., 2010). Previamente, nuestro grupo de trabajo reportó bajos niveles de ARNm del receptor de LH en los folículos quísticos (Marelli y col., 2014), un hallazgo que podría sustentar la menor expresión de p-ERK1/2 y la consiguiente mayor expresión de CYP19A1 detectada en este trabajo.

Con respecto a 3β -HSD, una enzima involucrada en la síntesis de androstenediona y en los primeros pasos en la síntesis del cortisol, las células de la granulosa de los quistes expresaron niveles mayores que las de los folículos antrales controles. En líquido folicular de quistes de vacas con EQO, detectamos niveles inferiores de progesterona respecto al líquido folicular de folículos de vacas control. Sin embargo, en estudios previos se ha reportado que los quistes poseen niveles aumentados de cortisol (Amweg y col., 2013), es decir que si bien detectamos menos Pg, hay un aumento de cortisol, por lo que la enzima podría estar primando esa última síntesis. Richards y Pangas (Richards y Pangas, 2010) informaron que también es necesaria la fosforilación de la vía MAPK-ERK 1/2 para la secreción de progesterona mediada por LH, lo que estaría de acuerdo con la menor Pg detectada en quistes, ya que encontramos

una menor expresión de p-ERK 1/2 en células de la granulosa de los quistes. Además dichos autores señalaron que cuando ERK1 y ERK2 se encuentran inhibidos en las células de la granulosa, ocurren cambios globales en la función del ovario y que, cuando se activan ERK1 y ERK2, el programa de expresión génica regulada por FSH se desactiva, con efectos sobre el crecimiento y la diferenciación del folículo preovulatorio.

Asimismo, en las células de la granulosa, las gonadotrofinas, particularmente la FSH, es capaz de potenciar la proliferación celular y la síntesis proteica actuando a través de mTOR y/o ERK, e inhibir la apoptosis a través de Akt1 y FOXO3a (Dupont y Scaramuzzi, 2016). En este sentido, los niveles disminuidos de p-mTOR y pERK 1/2 detectados podrían estar relacionados con las bajas tasas de proliferación y apoptosis informadas previamente en folículos quísticos de vacas con EQO en comparación con los controles (Salveti y col., 2010).

En células de teca bovina, Fukuda y col. (2009) postularon que la LH estimula la expresión génica de *CYP17A1* y la producción de andrógenos a través de la activación de la vía PI3K/Akt. Los resultados presentados en el presente capítulo mostraron que la expresión de pan-Akt fue menor en células de la teca de quistes que en folículos antrales controles, y que los niveles de expresión génica y proteica de *CYP17A1* fueron similares, sugiriendo que la expresión podría ser compensada por la acción de otras vías de señalización.

Los resultados obtenidos en este capítulo junto a otro trabajo previamente reportado por nuestro grupo (Hein y col., 2015) respaldan la idea de que el mantenimiento de las actividades óptimas de PI3K y la señalización MAPK/ERK dentro del ovario sería importante para el desarrollo folicular normal y la función ovárica, mostrando importantes variaciones en los folículos quísticos.

4. CAPÍTULO II:

***Alteración en las vías de
señalización de insulina en
un modelo de persistencia
folicular inducida***

4.1. CAPÍTULO II:

Introducción

En el ganado lechero, la enfermedad quística ovárica se asocia a múltiples trastornos fisiológicos que incluyen alteraciones en la foliculogénesis, esteroidogénesis y ovulación, y a diversos factores coexistentes como el estrés, el manejo del rodeo, el estado nutricional, la condición corporal y enfermedades infecciosas (Silvia y col., 2002).

Los quistes se desarrollan a partir de los folículos preovulatorios que no ovulan, persisten y luego interfieren con la función ovárica normal (Vanholder y col., 2006). Silvia y col. (2002) han propuesto que el defecto primario reside en el hipotálamo, que no libera GnRH de manera adecuada en respuesta a los estrógenos producidos por los folículos. Este fallo conduce a una falta de estímulo en la glándula pituitaria anterior para secretar la LH en frecuencia y amplitud necesaria para producir el pico preovulatorio. Esta insensibilidad hipotalámica a los estrógenos puede deberse a las concentraciones intermedias o subluteales de progesterona que se encuentran comúnmente en las vacas con EQO.

El estudio de los procesos que conducen a la falla en el proceso de ovulación y la persistencia de los folículos dominantes es uno de los caminos para comprender la patogénesis de la EQO. La principal dificultad para estudiar esta enfermedad en el bovino es que la formación del quiste sólo se puede reconocer retrospectivamente, después de que el folículo ha sufrido numerosos cambios morfológicos y fisiológicos (Roth y col., 2012). A partir de este problema, se han desarrollado numerosos modelos experimentales para inducir la enfermedad quística ovárica y así poder estudiarla desde el inicio de la formación de los quistes, es decir, desde las fases previas al establecimiento de la enfermedad. Estos modelos experimentales se llevaron a cabo mediante la administración de: 1) estrógenos exógenos (Kulick y col., 1999), 2) combinación de progesterona y estrógenos (Erb y col, 1973; Winters y col., 1986; Cook y col., 1990; Hamilton y col., 1995), 3) antisuero específico contra LH bovina (Nadaraja y Hansel, 1976), 4) testosterona (Fathalla y col., 1978) y 5) adrenocorticotrofina (ACTH) exógena (Liptrap y McNally, 1976; Refsal y col., 1987; Kawate y col., 1996; Ortega y col., 2008; Amweg y col., 2013). Entre los múltiples factores que intervienen en la etiopatogenia de la EQO, se ha demostrado que las concentraciones subluteales de progesterona son capaces de inducir un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH, inhibiendo el pico preovulatorio de LH y así la ovulación. En consecuencia, continúa el crecimiento que lleva a la persistencia de los folículos dominantes, incrementando las

concentraciones de estrógenos periféricos y reduciendo la fertilidad (Bridges y Fortune, 2003).

La persistencia de los folículos bovinos produce una reducción en la fertilidad luego de la ovulación e inseminación (Revah y Butler, 1996). Más aún, de lograrse la fertilización, la pérdida embrionaria temprana relacionada con la persistencia de los folículos dominantes es elevada.

Tanto las células de la granulosa como de la teca de los folículos de animales que presentan EQO conservan alta expresión de receptores de LH (Calder y col., 2001), postulándose que la persistencia y el crecimiento de los quistes dependerían del estímulo de LH (Marelli y col., 2014). Se conoce que los tratamientos que suprimen la frecuencia pulsátil de LH acortan la vida media de los quistes foliculares (Calder y col., 1999; Hatler y col., 2006).

Las ondas de crecimiento y regresión de los folículos ováricos bovinos se producen sucesivamente en un ambiente hormonalmente equilibrado, diferenciándose el folículo dominante en folículo preovulatorio en la ola final, luego de la regresión del CL. Si las concentraciones típicas de progesterona de la fase lútea son mantenidas experimentalmente, el ciclo estral puede extenderse en ondas regulares de crecimiento folicular y atresia continua (Sirois y Fortune, 1990; Stock y Fortune, 1993). Sin embargo, las concentraciones subluteales de progesterona circulantes extienden el ciclo mediante la inducción de un folículo dominante que permanece más tiempo que el normal (persistente). Con insuficiente progesterona para inducir la frecuencia pulsátil de LH adecuada y el pico preovulatorio, el folículo dominante continúa creciendo y secretando estrógenos, incluso en oportunidades en concentraciones mayores a las detectadas en proestro (Sirois y Fortune, 1990; Shaham-Albalancy y col., 2000; Díaz y col., 2015).

En nuestro grupo se desarrolló un modelo experimental de administración de progesterona a largo plazo (detallado en la sección “materiales y métodos”) para el estudio de las fases iniciales durante el desarrollo de quistes foliculares. En el modelo se demostró que el perfil endocrino, la dinámica de crecimiento y las características histológicas de los folículos ováricos persistentes fueron análogos a los de los quistes espontáneos. Además, se confirmó un papel local de los niveles subluteales de progesterona en la patogenia de la EQO y en los mecanismos reguladores de la función ovárica (Díaz y col., 2015).

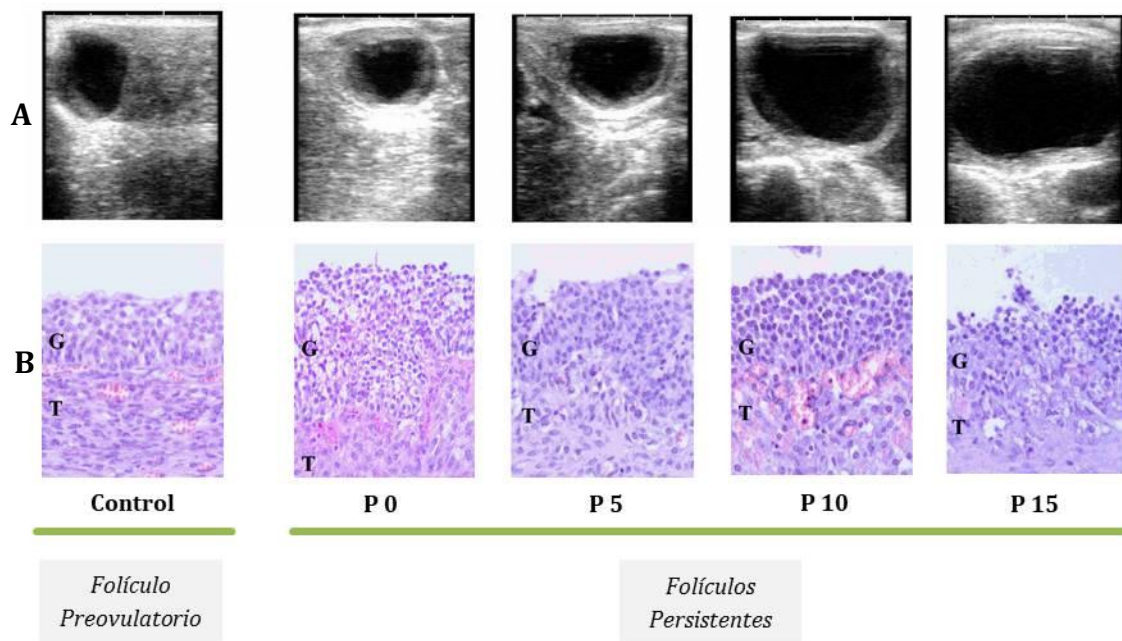


Figura 64: (A) Imágenes ecográficas representativas del folículo preovulatorio y con una persistencia de 0, 5, 10 y 15 días. (B) Imágenes microscópicas representativas de la pared folicular de los folículos preovulatorios de las vacas control y folículos con 0, 5, 10 y 15 días de persistencia folicular de vacas tratadas. G = Granulosa; T = Teca. Adaptado de: Díaz y col., 2015; Stassi y col., 2017.

Como se describió en el capítulo 1, la insulina cumple un rol determinante en el desarrollo y crecimiento folicular, y en la esteroidogénesis ovárica. Díaz y col. (2015) observaron similitudes en cuanto a las concentraciones de hormonas esteroideas en los folículos persistentes del modelo y los quistes espontáneos. Determinaron incrementos en las concentraciones de testosterona en suero y líquido folicular de animales con un folículo persistente de 15 días respecto a los animales controles (con folículo preovulatorio). Al mismo tiempo determinaron una menor concentración de 17β -estradiol en líquido folicular de folículos persistentes del grupo 15 respecto a los animales controles. Estos resultados previos podrían indicar una disminución en la actividad de enzimas esteroidogénicas como la CYP19A1, encargada de transformar la androstenediona en estrona, en las células de la granulosa.

Numerosos autores han descrito los efectos estimulantes de la insulina sobre la síntesis de estrógenos (Spicer y Echternkamp, 1995; Willis y col., 1996; Gutiérrez y col., 1997) y progesterona (Spicer y col., 1993; Taketani y col., 2008).

En el capítulo anterior, al evaluar quistes espontáneos, detectamos una disminución en la expresión proteica de algunos de los intermediarios de la cascada de

señalización de insulina, principalmente de la vía PI3K/Akt, elementos importantes en la regulación de la proliferación celular y en la esteroidogénesis.

Sumado a esto, Hein y col. (2015) ya habían determinado una disminución de la expresión del receptor de insulina en quistes foliculares bovinos.

Entender los mecanismos que preceden al desarrollo final de la EQO resulta de gran interés, porque esta enfermedad representa una causa importante de subfertilidad en el ganado lechero, generando grandes pérdidas económicas a la industria debido a las alteraciones provocadas en torno a la reproducción, tales como el aumento de los intervalos entre el parto y la concepción.

En base a los antecedentes nombrados, nos resultó interesante analizar los intermediarios de la vía PI3K/Akt de la señalización de insulina, estrechamente relacionados a la esteroidogénesis ovárica, en etapas previas al establecimiento del quiste y sus posibles alteraciones en el modelo de persistencia folicular.

Para ello nos propusimos detectar y cuantificar proteínas relacionadas con la transducción de las señales en respuesta a la insulina en células foliculares ováricas en un modelo de persistencia folicular, previamente desarrollado.

4.2. CAPÍTULO II:

Materiales y métodos

4.2.1. Procedimientos generales efectuados con animales

Todos los procedimientos realizados con animales fueron previamente aprobados por el Comité de Ética y Seguridad Institucional de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral de Santa Fe (Protocolo N° 131/12), y se realizaron de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (*Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*. 3° Ed. Federation of Animal Science Societies, 2010).

4.2.1.1. Animales y grupos de estudio

En el presente capítulo haremos referencia a 2 grupos de animales: grupo control y grupo con persistencia folicular inducida (este grupo a su vez incluye los subgrupos P0, P5, P10 y P15, descriptos más adelante).

Se utilizaron vacas 25 vacas Holando Argentino examinadas antes del comienzo de la experiencia para comprobar la normalidad en su tracto reproductor y regularidad de sus ciclos estrales. Las vacas pertenecían a productores locales y fueron evaluadas clínicamente antes y durante el desarrollo del modelo experimental, sin evidenciar algún tipo de enfermedad. Las características de los animales utilizados se describen en el capítulo 1.

4.2.1.1.1. Grupo control

Los animales del grupo control fueron sincronizados mediante el protocolo G6G-Ovsynch detallado en el capítulo 1, y las muestras fueron tomadas en proestro (día 18 del protocolo).

4.2.1.1.2. Grupos con persistencia folicular inducida

A los animales se los sometió a una sincronización de celo mediante el protocolo G6G, igual al grupo control, y luego se continuó con la aplicación de dispositivos de progesterona, como se describe más adelante. Los animales fueron divididos en 4

grupos, según el día esperado de ovulación en los controles: Persistencia 0 (P0), Persistencia 5 (P5), Persistencia 10 (P10) y Persistencia 15 (P15).

4.2.1.2. Modelo experimental

Las vacas fueron sometidas a la sincronización de sus ciclos estrales antes del comienzo de la experiencia, mediante un protocolo G6G-Ovsynch (Pursley y col., 1995; Bello y col., 2006), con algunas modificaciones (ya detallado en el capítulo 1). Una vez sincronizadas, se dividieron en los siguientes grupos: control (n = 5), P0 (tiempo esperado de ovulación, n = 5), P5 (5 días de persistencia folicular; n = 5), P10 (10 días de persistencia folicular, n = 5) y P15 (15 días de folicular persistencia; n = 5). Los animales del grupo control no recibieron tratamiento hormonal adicional y fueron sometidos a ovariectomía en proestro. Un día después de la última inyección de PGF2 α (día 16), se colocó un dispositivo de progesterona intravaginal (750 mg de progesterona micronizada, Pro-Ciclar P4-Zoovet®, Argentina), en hembras de los grupos P0, P5, P10 y P15, para obtener concentraciones subluteales de progesterona (1-2 ng/ml) (Bigelow y Fortune, 1998; Díaz y col., 2015; Stassi y col., 2017). Los dispositivos fueron mantenidos por 8 días, momento en el cual fueron reemplazados por otros nuevos. Para evitar cambios bruscos en las concentraciones de progesterona, los nuevos dispositivos fueron introducidos un día antes de removido el primer dispositivo. El tiempo esperado de ovulación fue aproximadamente 4 días posteriores a la administración de la primera dosis de PGF2 α el día 15 del protocolo (rango 101-106 h). El dispositivo intravaginal de progesterona se mantuvo durante 3 días hasta el día esperado de la ovulación (101-106 h después de la primera dosis de PGF2 α) en el grupo P0, durante 5 días después del día esperado de ovulación en el grupo P5, durante 10 días en el grupo P10 y 15 días en el grupo P15 (Figura 65).

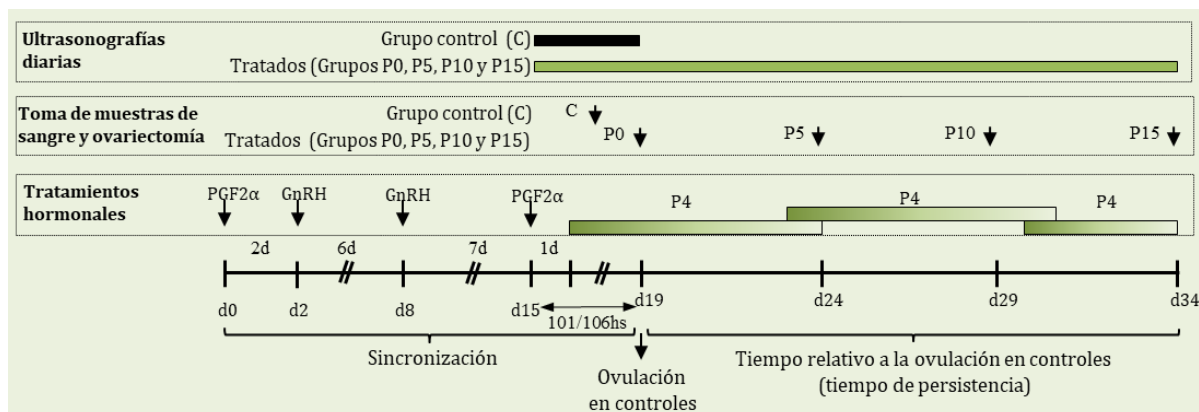


Figura 65: Diseño experimental para la inducción de persistencia folicular. Las ovariectomías fueron realizadas el día 18 para los controles (grupo sin dispositivo de progesterona), y a los 0, 5, 10 y 15 días de persistencia folicular (para los grupos tratados, es decir, a los días 19, 24, 29 y 34 del protocolo). Adaptado de Díaz y col., 2015; Stassi y col., 2017.

4.2.1.3. Monitoreo de los cambios ováricos

El desarrollo del modelo experimental fue monitoreado mediante ultrasonografía en todos los animales, utilizando un ecógrafo portátil equipado con un transductor lineal transrectal de 5 MHz HS101V (Honda, Tokio, Japón). El monitoreo del protocolo de sincronización se realizó en los días: 0, 2, 8 y 15. Además, se realizaron ecografías diarias desde el día de la última administración de PGF2α hasta la ovulación en los animales controles, o hasta los 0, 5, 10 y 15 días de persistencia folicular en los animales tratados. Los folículos se observaron como estructuras anecoicas presentes permanentemente en la misma posición y ovario.

4.2.1.4. Obtención de muestras

4.2.1.4.1. Toma de muestras de sangre

Los días de las ovariectomías se realizaron muestreos de sangre, es decir, el día 18 para el grupo control, y los días 19, 24, 29 y 34 para los grupos de persistencia folicular. En trabajos previos publicados por nuestro grupo se encuentra detallada la caracterización hormonal de este modelo de persistencia (Díaz y col., 2015, 2016). Las muestras de sangre se extrajeron de los vasos coccígeos, como se explicó en el capítulo 1, y una vez arribadas al laboratorio se procesaron inmediatamente.

4.2.1.4.2. Aspiración de líquido folicular guiada por ecografía

Previamente a la ovariectomía, para evitar la ruptura de los folículos de interés en el procedimiento quirúrgico, se realizó el aspirado del líquido folicular de los folículos persistentes de los animales de los grupos P0, P5, P10 y P15, y del folículo preovulatorio de los animales del grupo control. Para ello, se utilizó la misma técnica de aspiración folicular guiada por ecografía descrita en el capítulo 1. Después de la aspiración folicular, el líquido folicular obtenido fue refrigerado e inmediatamente transportado al laboratorio para su procesamiento.

4.2.1.4.3. Ovariectomía: mediante colpotomía

Para la extracción de los ovarios se realizó la ovariectomía vía transvaginal. Este procedimiento se llevó a cabo en los animales controles en proestro (día 18 del protocolo), y al final del período de tratamiento para cada grupo tratado, el día esperado para la ovulación (día 19 del protocolo = P0), y los días 5 (día 24 del protocolo = P5), 10 (día 29 del protocolo = P10) y 15 de persistencia (día 34 del protocolo = P15), puntos de muestreo relativos al momento esperado de ovulación (Figura x). Tanto los ovarios, como las estructuras foliculares de interés fueron medidos y fotografiados.

La técnica de ovariectomía por colpotomía se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Garnero y Perusia (2002), la cual pudo realizarse debido a que, al tratarse de hembras pluríparas, el tamaño de los genitales externos (vulva y vagina) era lo suficientemente espacioso como para permitir un cómodo acceso del cirujano, evitando de esta manera cicatrices indeseadas en zonas de valor comercial (flanco izquierdo). En primer lugar se realizó la sedación con 150 mg totales de clorhidrato de ketamina (Ketamina 10%, Alfazan®) y se efectuó anestesia epidural baja con 100 mg totales de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2%, Vetue®). En segundo lugar, se realizó la limpieza y desinfección del área perineal y de la cavidad vaginal con una solución de cloroxilenol (5 %). Para evitar rupturas de las estructuras foliculares, previo a la ovariectomía se realizó la extracción del líquido folicular mediante el sistema de aspiración descrito (capítulo 1). Mediante un tensor de vagina se alejó la pared dorsal de la vagina del recto, posteriormente utilizando un bisturí de hoja oculta se procedió a realizar una pequeña incisión de 2 cm en el fondo de la vagina, incidiendo el techo de la vagina y el peritoneo

hasta lograr una abertura que permitió introducir una mano dentro de la cavidad pélvica, localizar el útero y los ovarios, para retrotraerlos dentro de la cavidad vaginal. A continuación, se colocó una pinza hemostática Kocher modificada *ad hoc* (sin dientes) y se realizó la ligadura del pedículo ovárico por transfixión con hilo no absorbible simple (lino Nº14). Luego se procedió a la sección y extracción de ambos ovarios. Por último, los animales fueron tratados con antibióticos, coagulantes, antiinflamatorios y antiparasitarios externos (Figura 66).



Figura 66: Ovariectomía bilateral por colpotosomía. A) Aplicación de la anestesia epidural. B) Limpieza de la zona perineal. C) y D) Ligadura de ovarios vía transvaginal con hilo de lino. E) Ovario extraído, medición de sus dimensiones. F) Medición del folículo de interés y procesamiento.

4.2.2. Procesamiento de muestras

El esquema de las muestras procesadas en el laboratorio se muestra en la Figura 67. El procesamiento de las muestras para las diferentes técnicas se describió con mayores detalles en el capítulo 1.

TIPO DE MUESTRA	GRUPO	DESTINO
Ovario completo	⇒ <i>CONTROL</i> ⇒ <i>PERSISTENCIA</i>	IHQ INDIRECTA
Aspiración folicular: líquido folicular	⇒ <i>CONTROL</i> ⇒ <i>PERSISTENCIA</i>	MEDICIONES HORMONALES
Sangre: suero	⇒ <i>CONTROL</i> ⇒ <i>PERSISTENCIA</i>	MEDICIONES HORMONALES

Figura 67: Esquema de la procedencia y destino de las muestras obtenidas.

4.2.3. Cuantificación insulina en suero y líquido folicular

Las concentraciones séricas e intrafoliculares de insulina fueron analizadas mediante radioinmunoanálisis como se detalló en el capítulo 1.

4.2.4. Detección y cuantificación de intermediarios de la cascada de señalización de insulina en el modelo de persistencia folicular

4.2.4.1. Análisis por western blot

La especificidad de los anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica se realizó por western blot (Tabla 6). Para ello utilizamos ovarios de frigorífico, como se describe en el capítulo 1. En la tabla 6 se detallan las condiciones utilizadas para los diferentes anticuerpos. La técnica completa fue descrita en el capítulo 1.

Además, se realizó el análisis BLAST (análisis de homología de las proteínas contra las cuales se usan anticuerpos reactivos para especies diferentes a la de *Bos taurus*) para todos los anticuerpos utilizados, arrojando resultados de homología entre 83% y 99%.

Tabla 6: Anticuerpos, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de Western blot.

Anticuerpo primario	Dilución	PM	Anticuerpo secundario	Dilución
Insulin Rβ Policlonal (sc-711, Santa Cruz)	1/150	95 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1/10000
p-insulin Rβ Monoclonal (sc-81500, Santa Cruz)	1/100	95 kDa	Goat anti-mouse IgG HRP (sc-2005, Santa Cruz)	1/10000
IRS-1 Policlonal (sc-559, Santa Cruz)	1/750	170 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1/10000
Anti-IRS1 (phospho Y896) Monoclonal (ab-46800, Abcam)	1/100	170 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1/10000
PI3K Policlonal (sc-423, Santa Cruz)	1/150	80 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1/10000
p-Akt 1/2/3 Monoclonal (sc-271966, Santa Cruz)	1/200	62/56/60 kDa	Goat anti-mouse IgG HRP (sc-2005, Santa Cruz)	1/10000

4.2.4.2. Inmunohistoquímica indirecta

Se evaluó la expresión proteica de IR, p-IR, IRS1, p-IRS1, PI3K, panAkt, p-panAkt en el grupo control y en todos los grupos de persistencia folicular (P0, P5, P10 y P15). Para realizar el análisis sistemático de los folículos presentes en el ovario utilizamos la clasificación específica para la especie bovina descrita por Braw-Tal y Yossefi (1997), como se detalla en el capítulo 1, clasificando a los folículos en: primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG) y antrales (A). Además, en el grupo control se tomaron en cuenta como una clasificación diferenciada (de los antrales), los folículos preovulatorios. En el caso de los grupos de persistencia, se evaluaron los folículos persistentes respectivos a cada grupo según la caracterización histológica realizada por Díaz y col., 2015 y Stassi y col., 2017.

El procedimiento fue descrito en el capítulo 1. En la Tabla 7 se detallan las características más relevantes de los anticuerpos y las condiciones utilizadas:

Tabla 7: Anticuerpos, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario	Condiciones	Recuperación antigénica	Tipo de bloqueo	Anticuerpo secundario
Insulin Rβ (C-19) Policlonal (sc-711, Santa Cruz)	1/150 Toda la noche a 4°C	Microondas convencional	Suero normal de cabra al 10%	Goat anti-rabbit IgG biotinilado (sc- 2040, Santa Cruz)
p-insulin Rβ (10C3) Monoclonal (sc-81500, Santa Cruz)	1/100 Toda la noche a 4°C	Intensa en microondas	Sin bloqueo	Secundario universal (CytoScan HRP detection system- Cell Marque)
IRS-1 (C-20) Policlonal (sc-559, Santa Cruz)	1/1000 Toda la noche a 4°C	Microondas convencional	Suero normal de cabra al 10%	Goat anti-rabbit IgG biotinilado (sc- 2040, Santa Cruz)
Anti-IRS1 (phospho Y896) Monoclonal (ab46800, Abcam)	1/100 Toda la noche a 4°C	Intensa en microondas	Sin bloqueo	Secundario universal (CytoScan HRP detection system- Cell Marque)
PI3K p85α (Z8) Policlonal (sc-423, Santa Cruz)	1/400 Toda la noche a 4°C	Microondas convencional	Sin bloqueo	Secundario universal (CytoScan HRP detection system- Cell Marque)
Anti - pan-AKT Policlonal (ab-18785, Abcam)	1/100 Toda la noche a 4°C	Microondas convencional	Sin bloqueo	Secundario universal (CytoScan HRP detection system- Cell Marque)
p-Akt 1/2/3 (B-5) Monoclonal (sc-271966, Santa Cruz)	1/50 Toda la noche a 4°C	Microondas convencional	Sin bloqueo	Secundario universal (CytoScan HRP detection system- Cell Marque)

4.2.5. Evaluación estadística

Las concentraciones séricas y en líquido folicular de insulina en los animales controles y tratados al momento de la toma de muestras, fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan.

Para evaluar la expresión proteica mediante inmunohistoquímica, se realizó un análisis de la varianza de los datos aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan. Se analizaron por separado las estructuras foliculares análogas (folículos primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales y persistentes) de cada grupo en estudio. También se compararon los folículos preovulatorios del grupo control (como estructuras de referencia) con los folículos persistentes (P0, P5, P10 y P15). Además, se evaluó el comportamiento de la expresión proteica a lo largo de la foliculogénesis dentro de cada grupo en estudio. La comparación entre dos grupos de muestras se realizó mediante la prueba *t-Student*.

Para todos los análisis estadísticos, $p < 0,05$ se consideró significativo. Los valores se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM).

4.3. CAPÍTULO II:

Resultados

4.3.1. Cuantificación de insulina

Las concentraciones de insulina se determinaron en el líquido folicular de folículos preovulatorios del grupo control y de folículos persistentes de los grupos P0, P5, P10 y P15, y en el suero de todos los grupos.

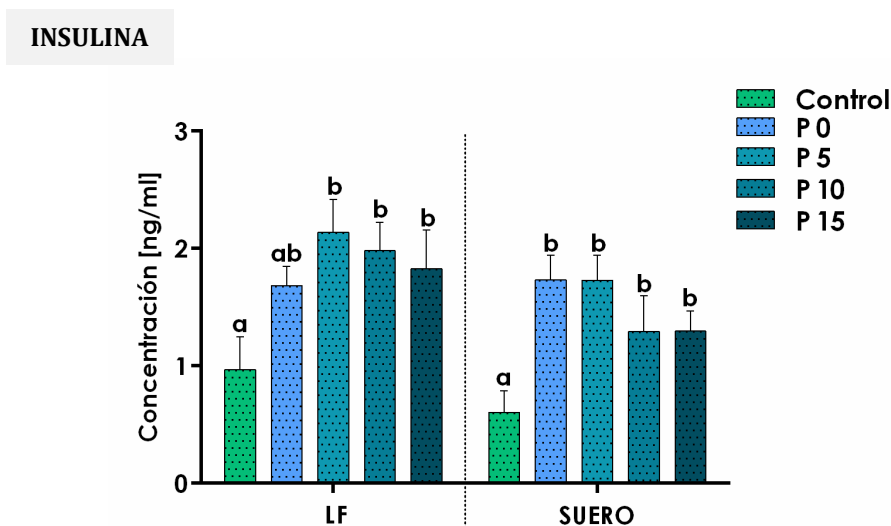


Figura 68: Concentración de insulina en líquido folicular (LF) y suero en animales de los grupos control, P0 (0 días de persistencia), P5 (5 días de persistencia), P10 (10 días de persistencia) y P15 (15 días de persistencia). Las barras representan las medias \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$).

Las concentraciones séricas de insulina fueron mayores en todos los grupos de persistencia (P0, P5, P10 y P15) respecto a los animales controles ($p < 0,05$). Las concentraciones de insulina en el líquido folicular fueron mayores en folículos persistentes de los grupos P5, P10 y P15 respecto a los folículos preovulatorios del grupo control ($p < 0,05$) (Figura 68).

4.3.2. Expresión y localización proteica de IR, p-IR, IRS1, p-IRS1, PI3K, panAkt y p-panAkt

La expresión proteica de IR, p-IR, IRS1, p-IRS1, PI3K, Akt y p-Akt fue evaluada por inmunohistoquímica. En ninguno de los controles negativos se detectó inmunomarcación. La comprobación de la especificidad de los anticuerpos utilizados,

realizada mediante western blot, confirmó la unión específica de los anticuerpos para las proteínas evaluadas con ausencia de reacciones cruzadas (Figuras 70, 79, 88, 97, 106, 115 y 124).

4.3.2.1. Expresión proteica y localización del IR

El IR fue localizado por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca de todos los folículos y grupos analizados (Figura 70, 71, 72, 73, 74 y 77).

4.3.2.1.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

La expresión proteica del IR en células de la granulosa del grupo control fue mayor en los folículos preovulatorios respecto a las demás categorías ($p < 0,05$). En las células de la teca no se observaron diferencias significativas entre las distintas estructuras ($p > 0,05$) (Figuras 69 y 70).

La expresión proteica del IR en células de la granulosa del grupo P0 fue similar en todas las estructuras foliculares evaluadas ($p > 0,05$). En las células de la teca determinamos una mayor expresión del IR en los folículos antrales y persistentes respecto a los folículos preantrales grandes ($p < 0,05$) (Figura 69 y 71).

La expresión proteica del IR en células de la granulosa del grupo P5 fue mayor en los folículos antrales respecto a los folículos primarios, preantrales pequeños y preantrales grandes ($p < 0,05$), sin diferencias con los folículos persistentes ($p > 0,05$). En las células de la teca determinamos una mayor expresión del IR en los folículos antrales y persistentes respecto a los folículos preantrales grandes ($p < 0,05$) (Figura 69 y 72).

La expresión proteica del IR en células de la granulosa del grupo P10 fue similar para todas las estructuras foliculares ($p > 0,05$). En las células de la teca determinamos una mayor expresión del IR en los folículos antrales y persistentes respecto a los folículos preantrales grandes ($p < 0,05$) (Figura 69 y 73).

En el grupo P15, la expresión proteica del IR en ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) fue similar a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figura 69 y 74).

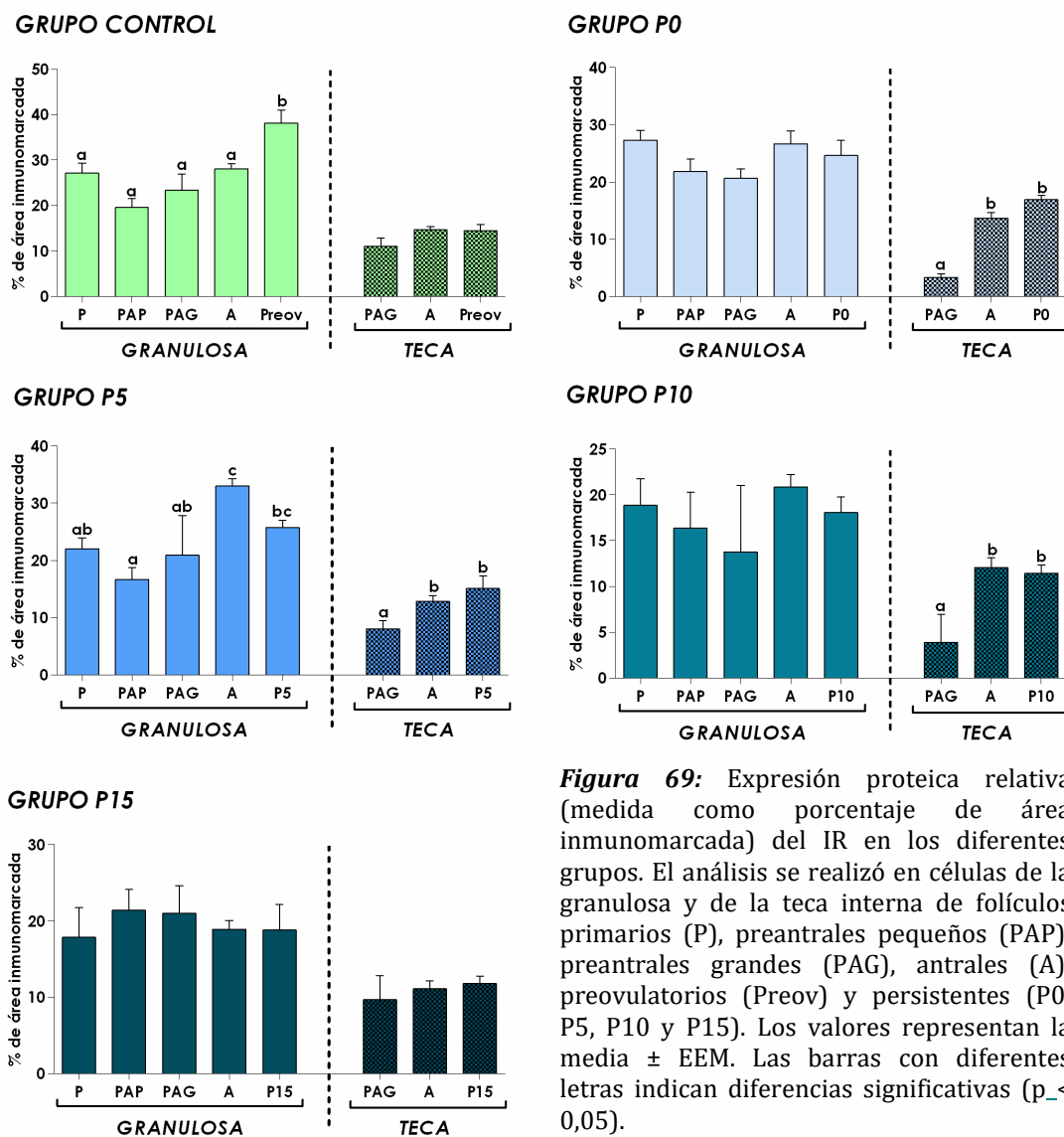


Figura 69: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del IR en los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (P0, P5, P10 y P15). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

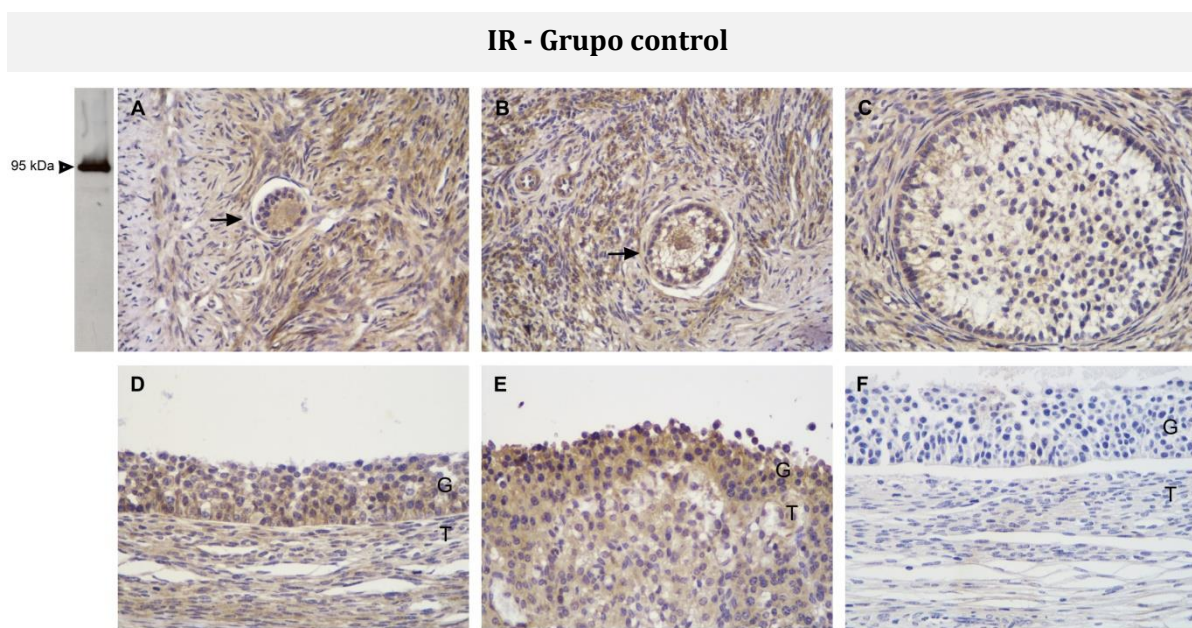


Figura 70: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo preovulatorio. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 95 KDa correspondientes a IR. Magnificación 400 X.

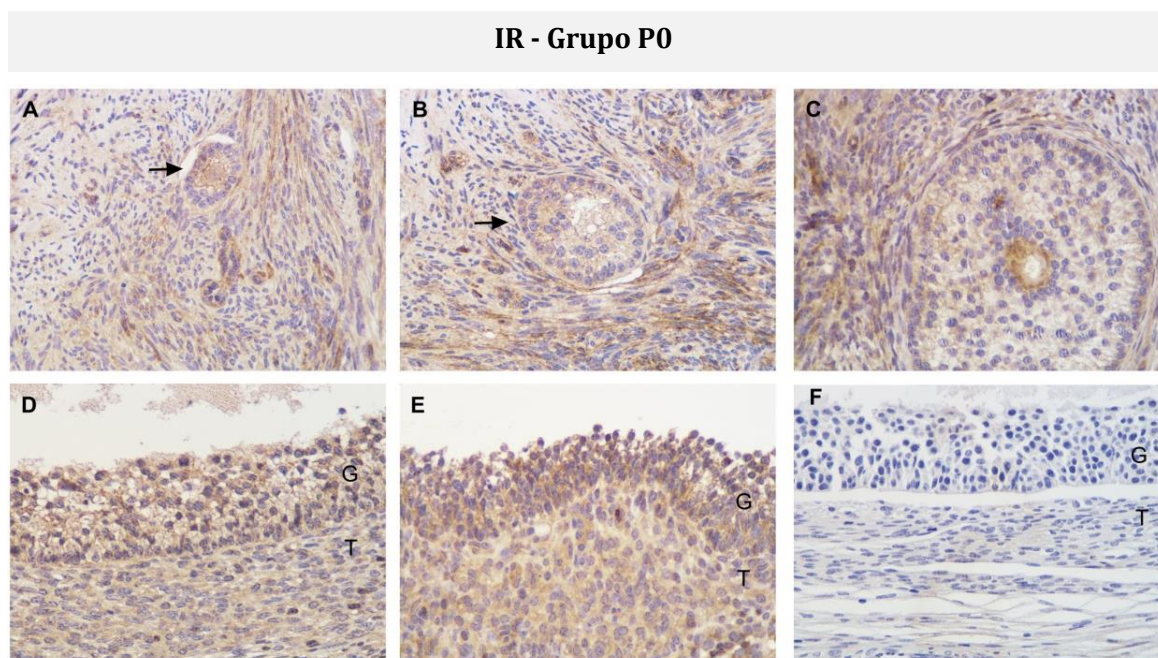


Figura 71: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR en diferentes categorías foliculares del grupo P0. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

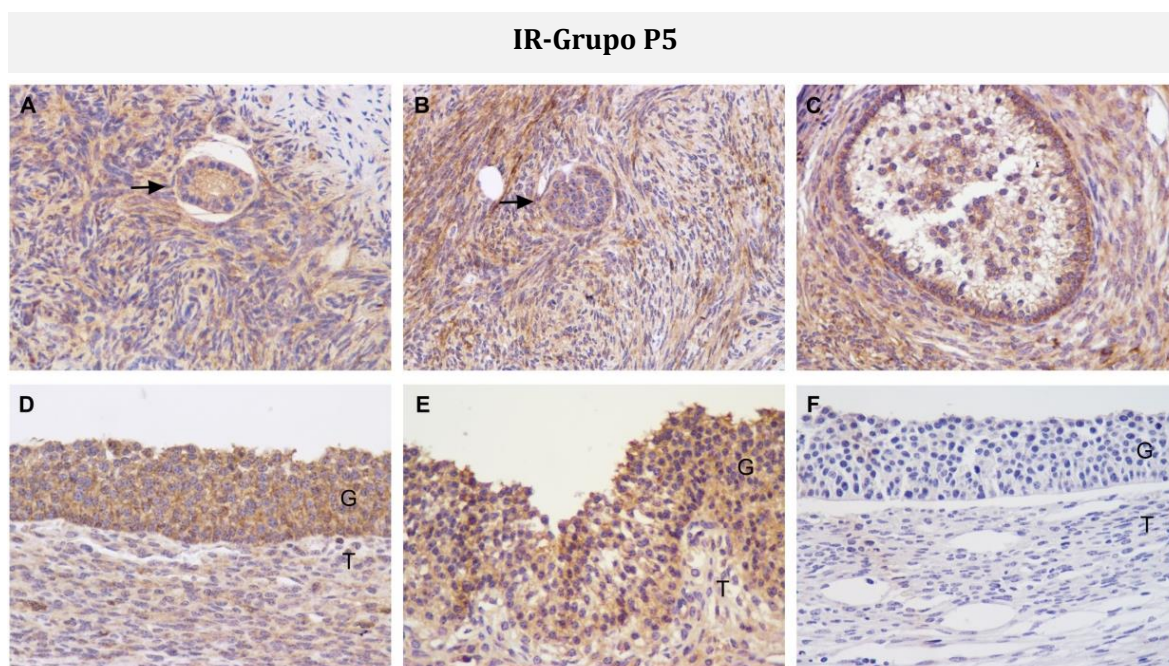


Figura 72: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR en diferentes categorías foliculares del grupo P5. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

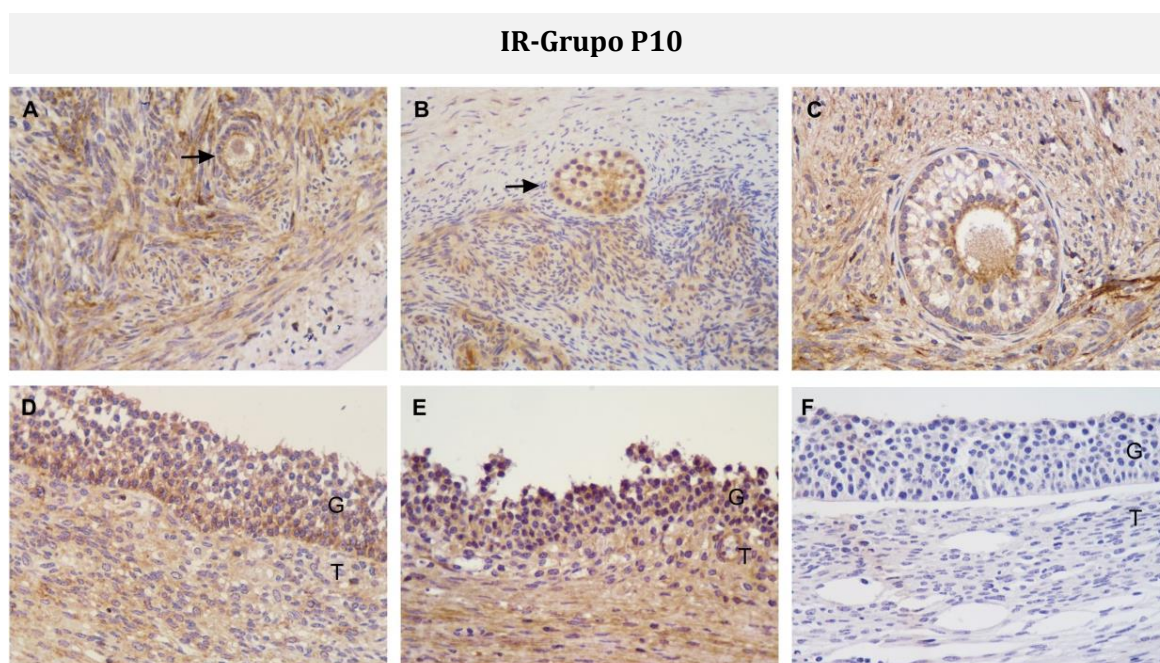
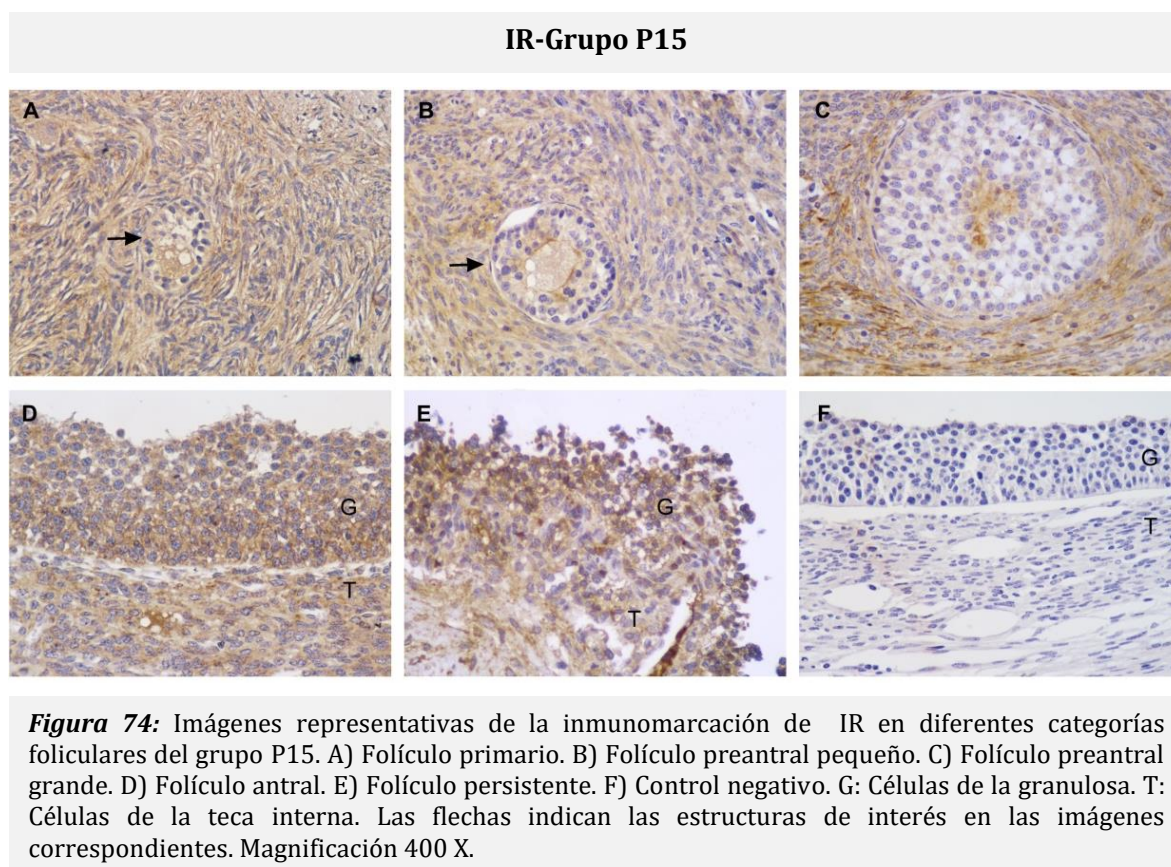


Figura 73: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR en diferentes categorías foliculares del grupo P10. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.



4.3.2.1.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

Se realizó un análisis de la expresión en células de la granulosa y de la teca interna por categoría folicular entre los distintos grupos.

En células de la granulosa, la expresión proteica del IR en los folículos primarios fue mayor en los grupos control y P0 respecto al grupo P5 ($p < 0,05$). En los folículos antrales la expresión fue mayor en el grupo P5 respecto a los demás grupos ($p < 0,05$), y su vez la expresión en los grupos control y P0 fue mayor que en los grupos P10 y P15 ($p < 0,05$). Por otro lado, la expresión proteica del IR fue mayor en los folículos preovulatorios del grupo control respecto a todos los folículos persistentes de los demás grupos (P0, P5, P10 y P15) ($p < 0,05$) (Figuras 75 y 77).

En células de la teca, la expresión del IR fue mayor en los folículos persistentes de los grupos P0 y P5 respecto a los grupos P10 y P15 ($p < 0,05$), sin diferencias con el grupo control ($p > 0,05$). En las categorías restantes, la expresión del IR fue similar para todos los grupos ($p > 0,05$) (Figuras 76 y 77).

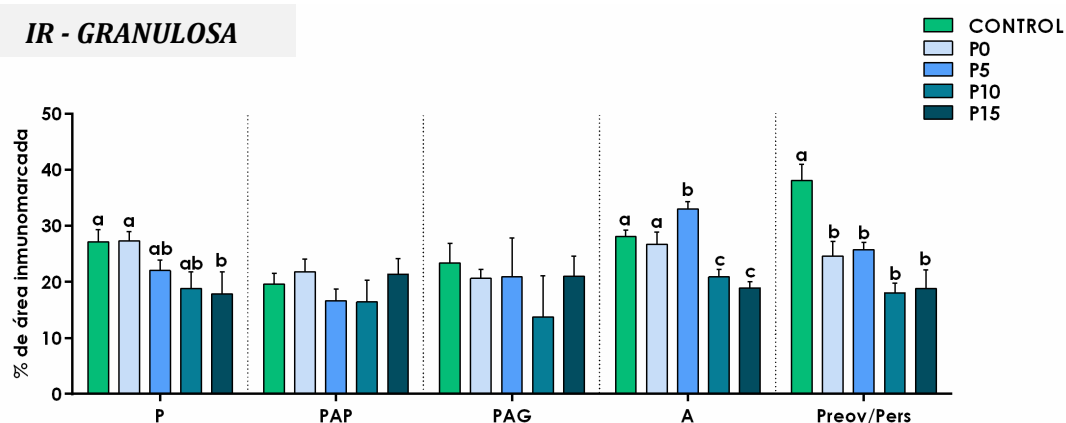
IR - GRANULOSA

Figura 75: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del IR en células de la granulosa de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

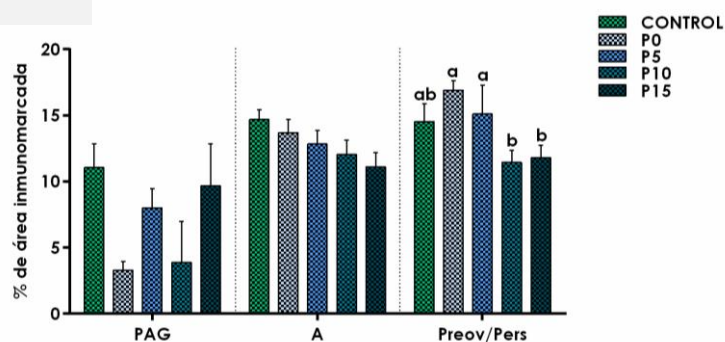
IR - TECA

Figura 76: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del IR en células de la teca de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la teca interna de folículos preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

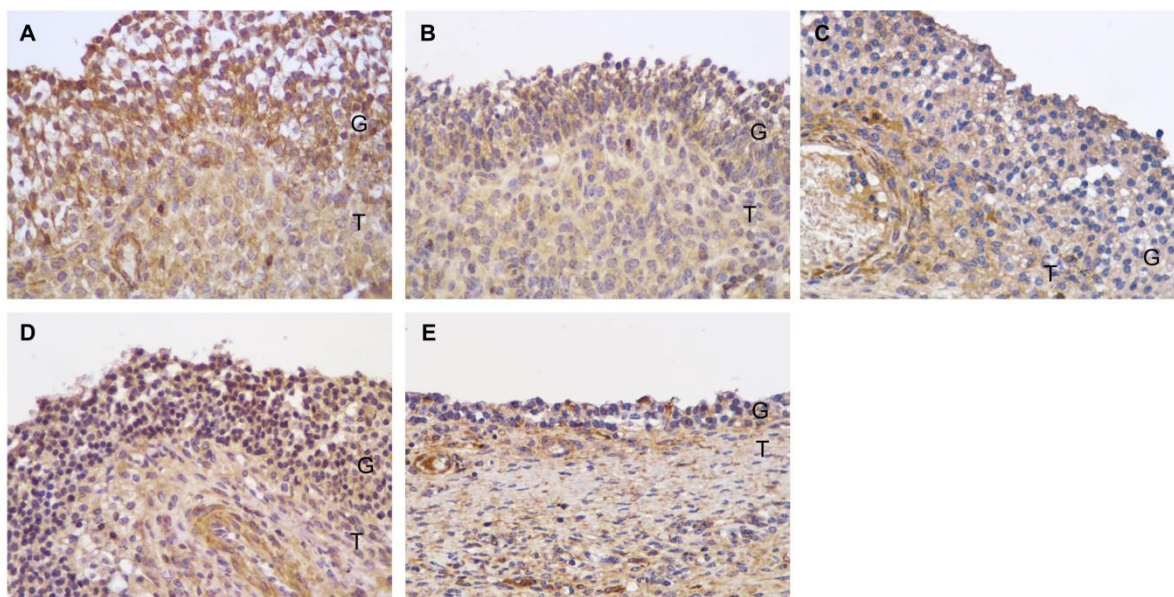


Figura 77: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR en los diferentes grupos. A) Folículo preovulatorio del grupo control. B) Folículo persistente del grupo P0. C) Folículo persistente del grupo P5. D) Folículo persistente del grupo P10. E) Folículo persistente del grupo P15. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Magnificación 400x.

4.3.2.2. Expresión proteica y localización del p-IR

El p-IR (IR fosforilado) fue localizado por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca de todos los folículos y grupos analizados (Figuras 79, 80, 81, 82, 83 y 86).

4.3.2.2.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

La expresión proteica del p-IR en células de la granulosa del grupo control fue similar en todas las categorías foliculares ($p > 0,05$). En las células de la teca la expresión fue mayor en los folículos preovulatorios respecto a los folículos preantrales grandes y antrales ($p < 0,05$) (Figuras 78 y 79).

La expresión proteica del p-IR en células de la granulosa y de la teca del grupo P0 fue similar en todas las categorías foliculares ($p > 0,05$) (Figuras 78 y 80).

La expresión proteica del p-IR en células de la granulosa del grupo P5 fue mayor en los folículos preantrales pequeños, preantrales grandes y antrales respecto al folículo

preovulatorio ($p < 0,05$). En las células de la teca la expresión fue similar en todas las categorías foliculares correspondientes ($p > 0,05$) (Figuras 78 y 81).

La expresión proteica del p-IR en células de la granulosa y de la teca de los grupos P10 y P15 fue similar en todas las categorías foliculares dentro del mismo grupo ($p > 0,05$) (Figuras 78, 82 y 83).

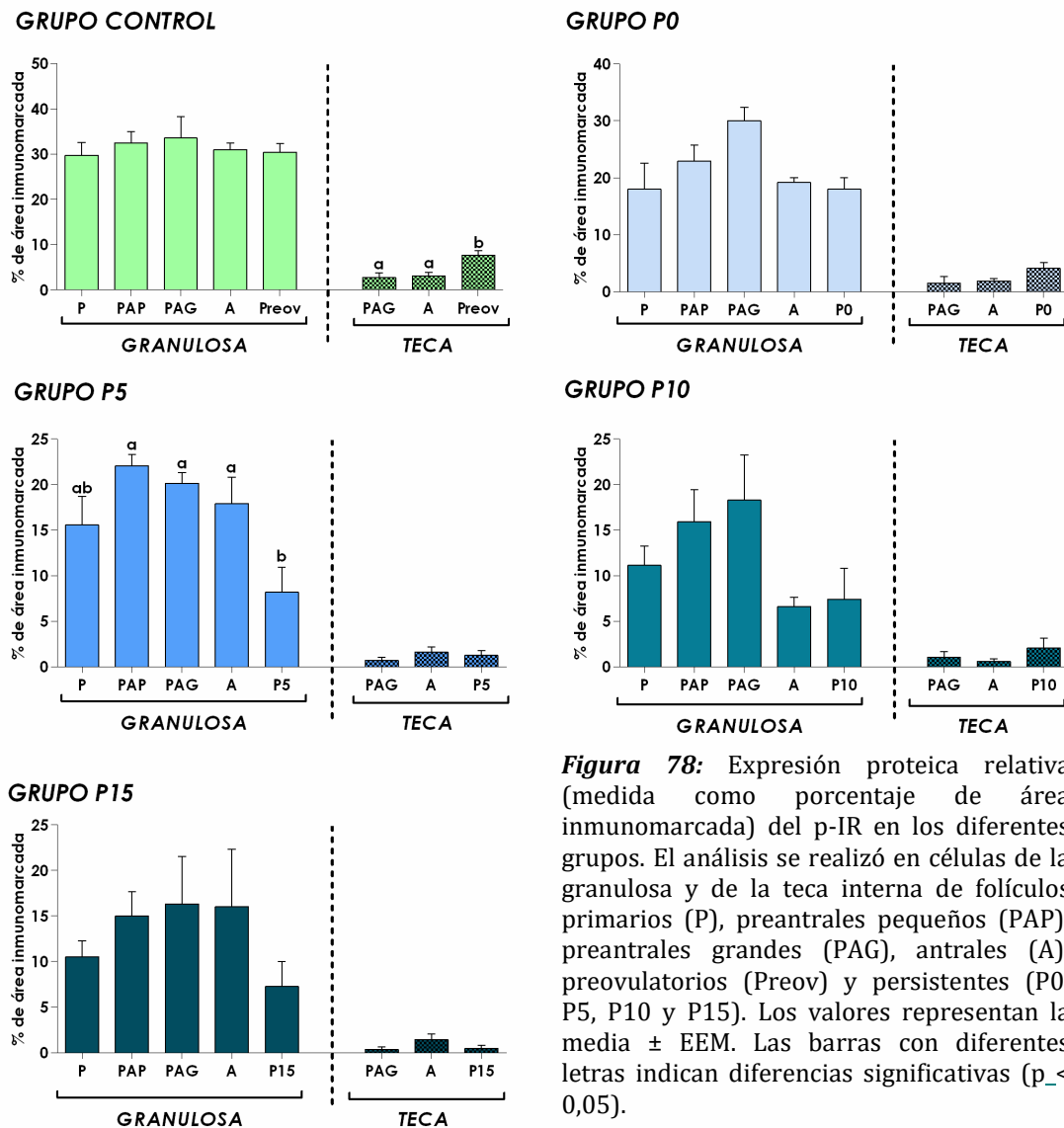


Figura 78: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-IR en los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (P0, P5, P10 y P15). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

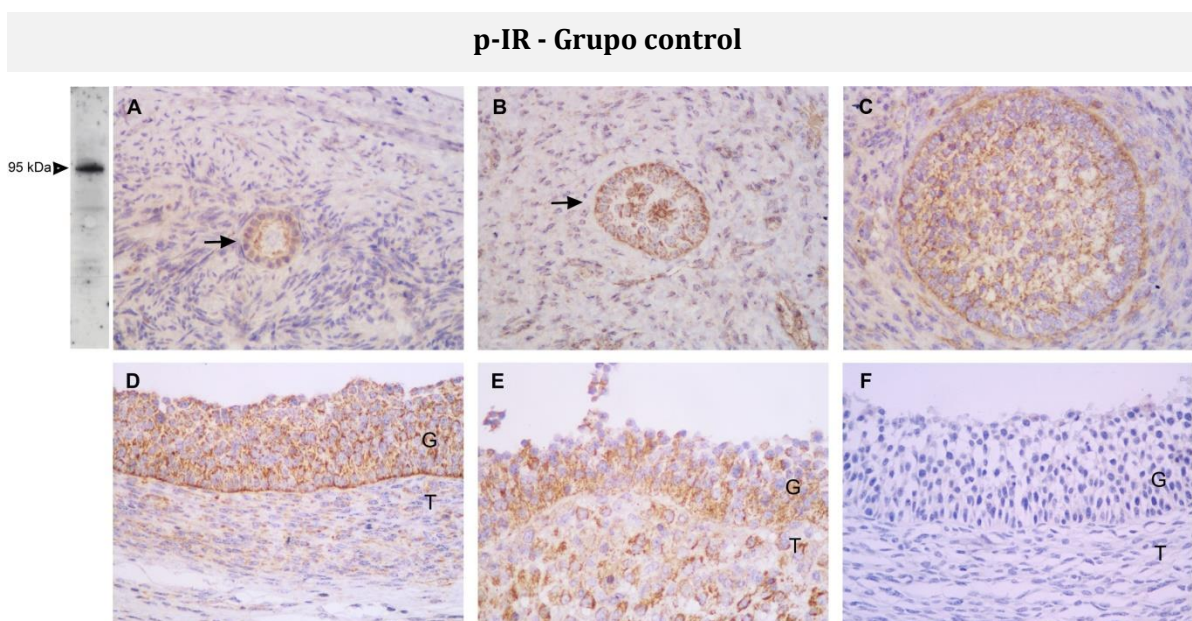


Figura 79: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IR en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo preovulatorio. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 95 KDa correspondientes a p-IR. Magnificación 400 X.

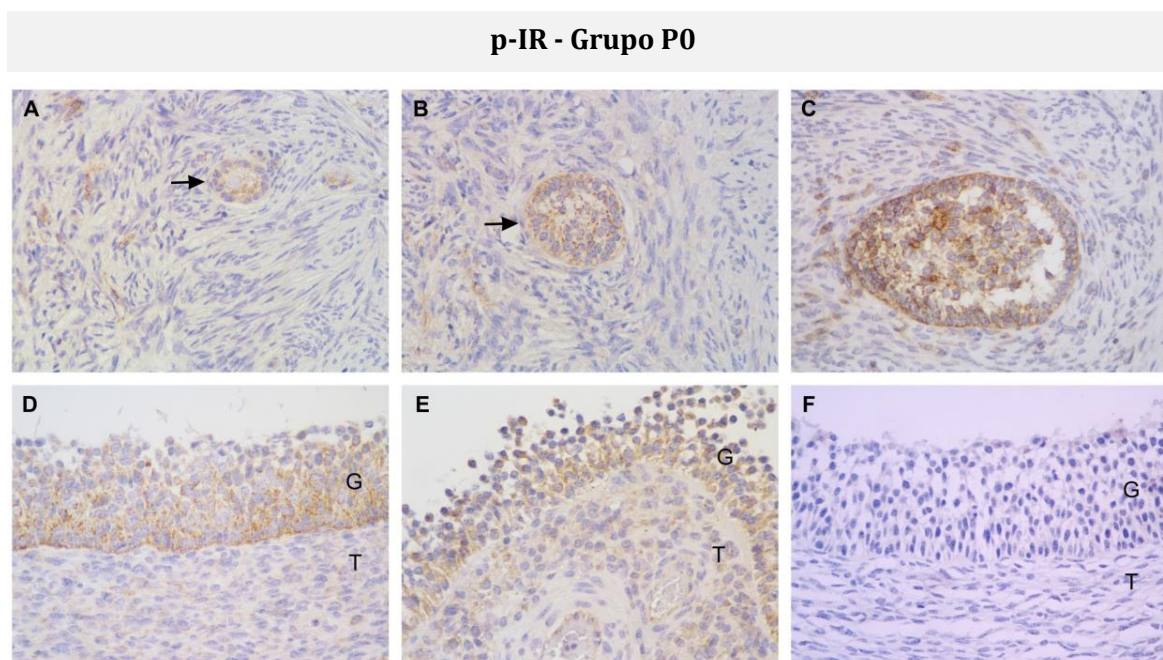


Figura 80: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IR en diferentes categorías foliculares del grupo P0. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

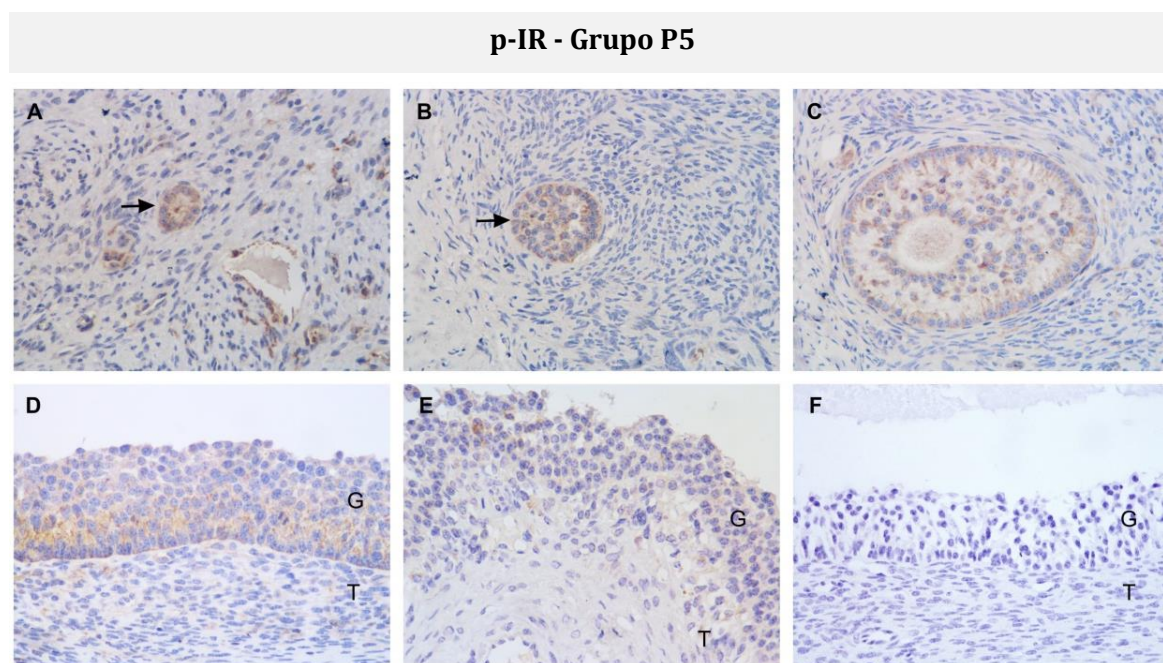


Figura 81: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IR en diferentes categorías foliculares del grupo P5. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

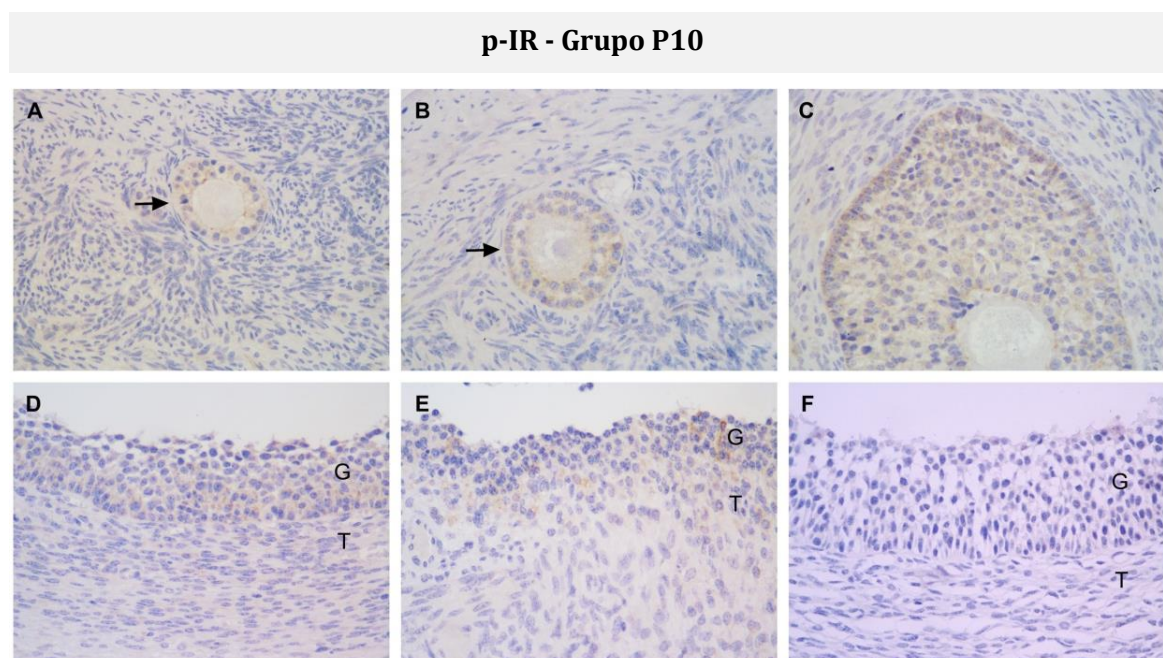


Figura 82: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IR en diferentes categorías foliculares del grupo P10. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

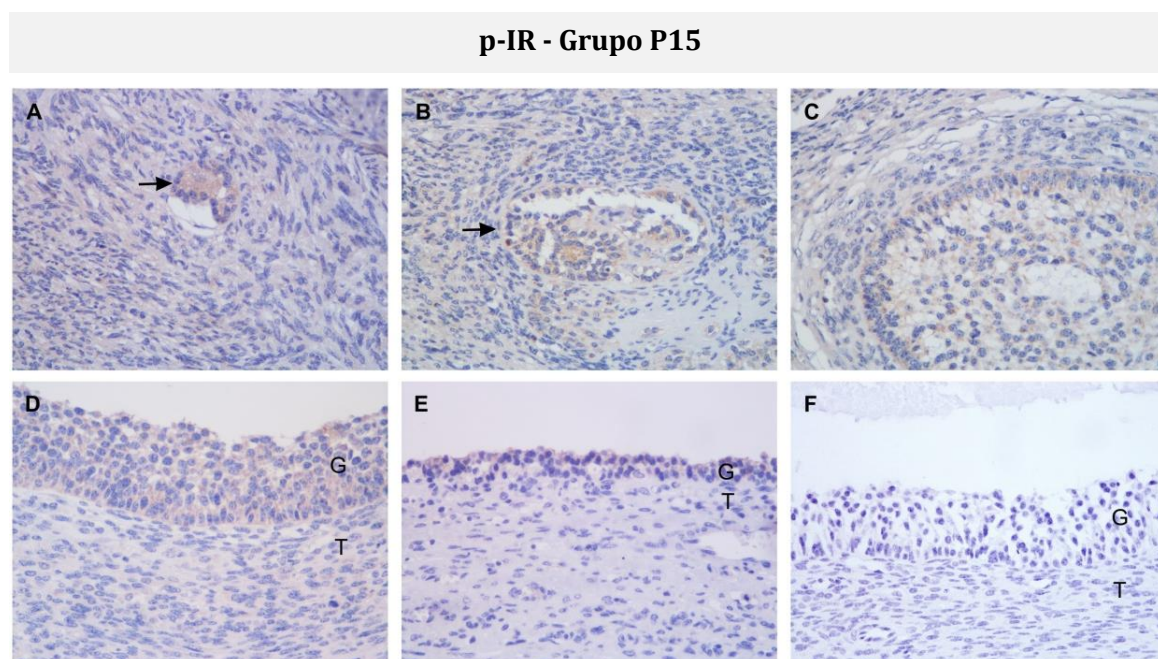


Figura 83: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IR en diferentes categorías foliculares del grupo P15. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

4.3.2.2.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

Se realizó un análisis de la expresión en células de la granulosa y de la teca interna por categoría folicular entre los distintos grupos.

En células de la granulosa, la expresión proteica del p-IR en los folículos primarios y preantrales pequeños fue mayor en el grupo control respecto a los demás grupos ($p < 0,05$). En los folículos preantrales grandes, la expresión del p-IR fue mayor en el grupo control respecto a los grupos P 5, P 10 y P 15 ($p < 0,05$). En los folículos antrales y preovulatorios la expresión proteica del p-IR fue mayor que en todos los grupos de persistencia ($p < 0,05$), a la vez que los antrales de los grupos P0, P5 y P15 tuvieron una mayor expresión que los antrales del grupo P5 ($p < 0,05$). A su vez, los folículos persistentes del grupo P0 mostraron una mayor expresión del p-IR que los persistentes de los grupos P5, P10 y P15 ($p < 0,05$) (Figuras 84 y 86).

En células de la teca, la expresión del p-IR fue mayor en los folículos preovulatorios del grupo control respecto a todos los folículos persistentes ($p < 0,05$).

Además, los folículos persistentes de grupo P0 mostraron mayor expresión que los folículos persistentes del grupo P15 ($p < 0,05$). En las demás categorías foliculares la expresión del p-IR fue similar para todos los grupos ($p > 0,05$) (Figuras 85 y 86).

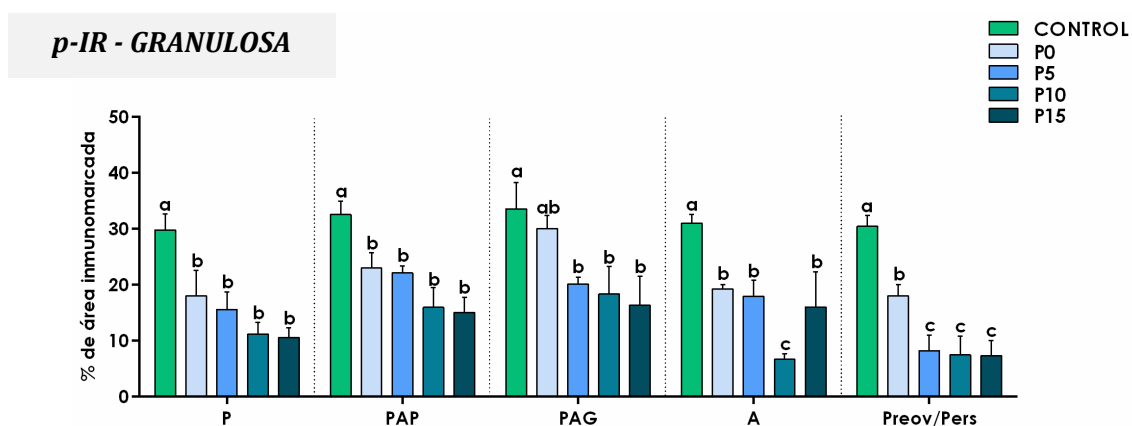


Figura 84: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-IR en células de la granulosa de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

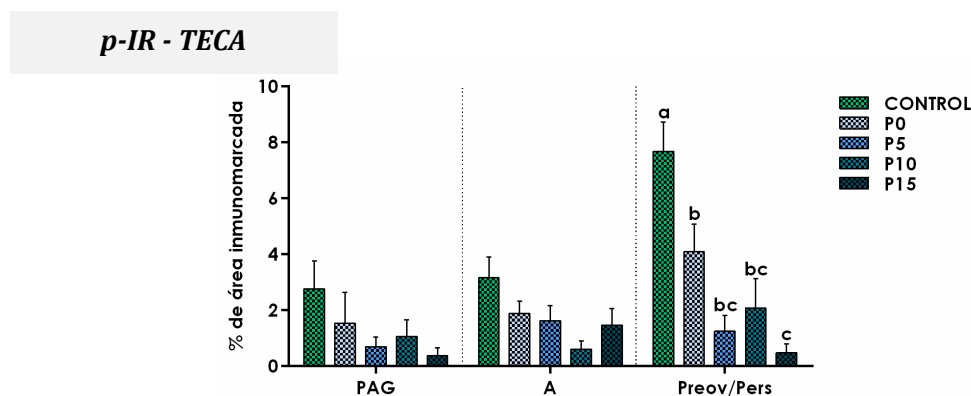


Figura 85: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-IR en células de la teca de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la teca interna de folículos preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

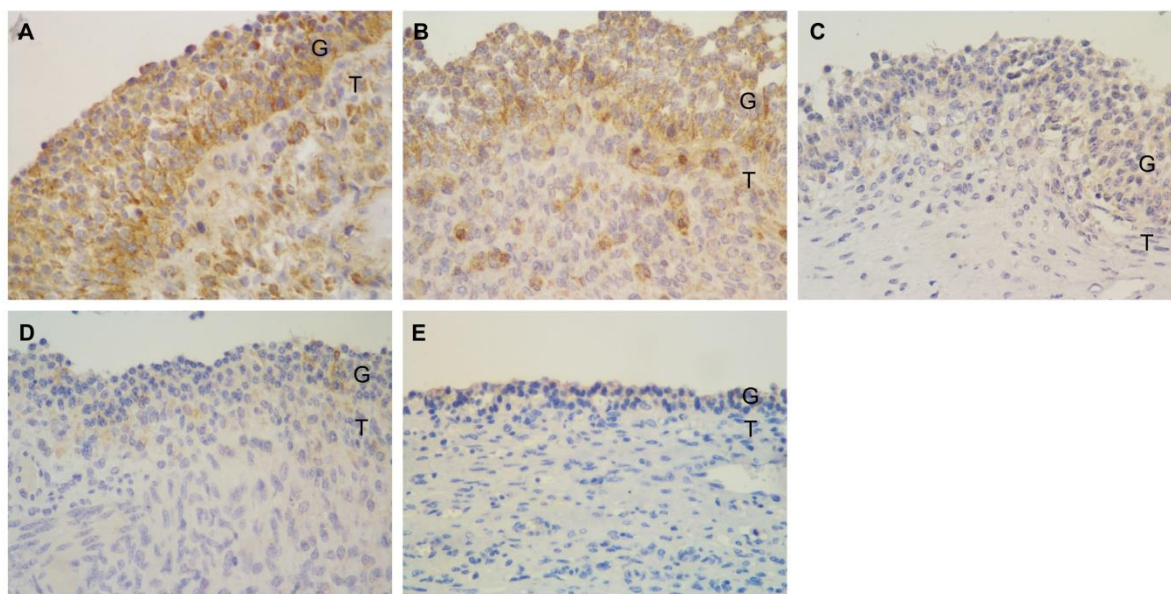


Figura 86: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS en los diferentes grupos. A) Folículo preovulatorio del grupo control. B) Folículo persistente del grupo P0. C) Folículo persistente del grupo P5. D) Folículo persistente del grupo P10. E) Folículo persistente del grupo P15. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Magnificación 400x.

4.3.2.3. Expresión proteica y localización de IRS1

El IRS1 fue localizado por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca de todos los folículos y grupos analizados (Figuras 88, 89, 90, 91, 92 y 95).

4.3.2.3.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

La expresión proteica del IRS1 en células de la granulosa del grupo control fue similar en las diferentes estructuras a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$). En las células de la teca determinamos una mayor expresión del IRS1 en los folículos antrales y dominantes respecto a los folículos preantrales grandes ($p < 0,05$) (Figuras 87 y 88).

En el grupo P0, la expresión proteica del IRS1 en ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) fue similar a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figuras 87 y 89).

En el grupo P5, la expresión proteica del IRS1 en ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) fue similar a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figuras 87 y 90).

La expresión del IRS1 en el grupo P10 fue similar en las células de la granulosa en todas las estructuras ($p > 0,05$). En células de la teca, la expresión del IRS1 fue mayor en

los folículos antrales respecto a los folículos preantrales grandes ($p < 0,05$), sin detectar diferencias con los folículos persistentes ($p > 0,05$) (Figuras 87 y 91).

La expresión del IRS1 en células de la granulosa del grupo P15 fue mayor en los folículos preantrales pequeños respecto a folículos preantrales grandes, antrales y persistentes ($p < 0,05$), sin diferencias con los folículos primarios ($p > 0,05$) (Figuras 87 y 92).

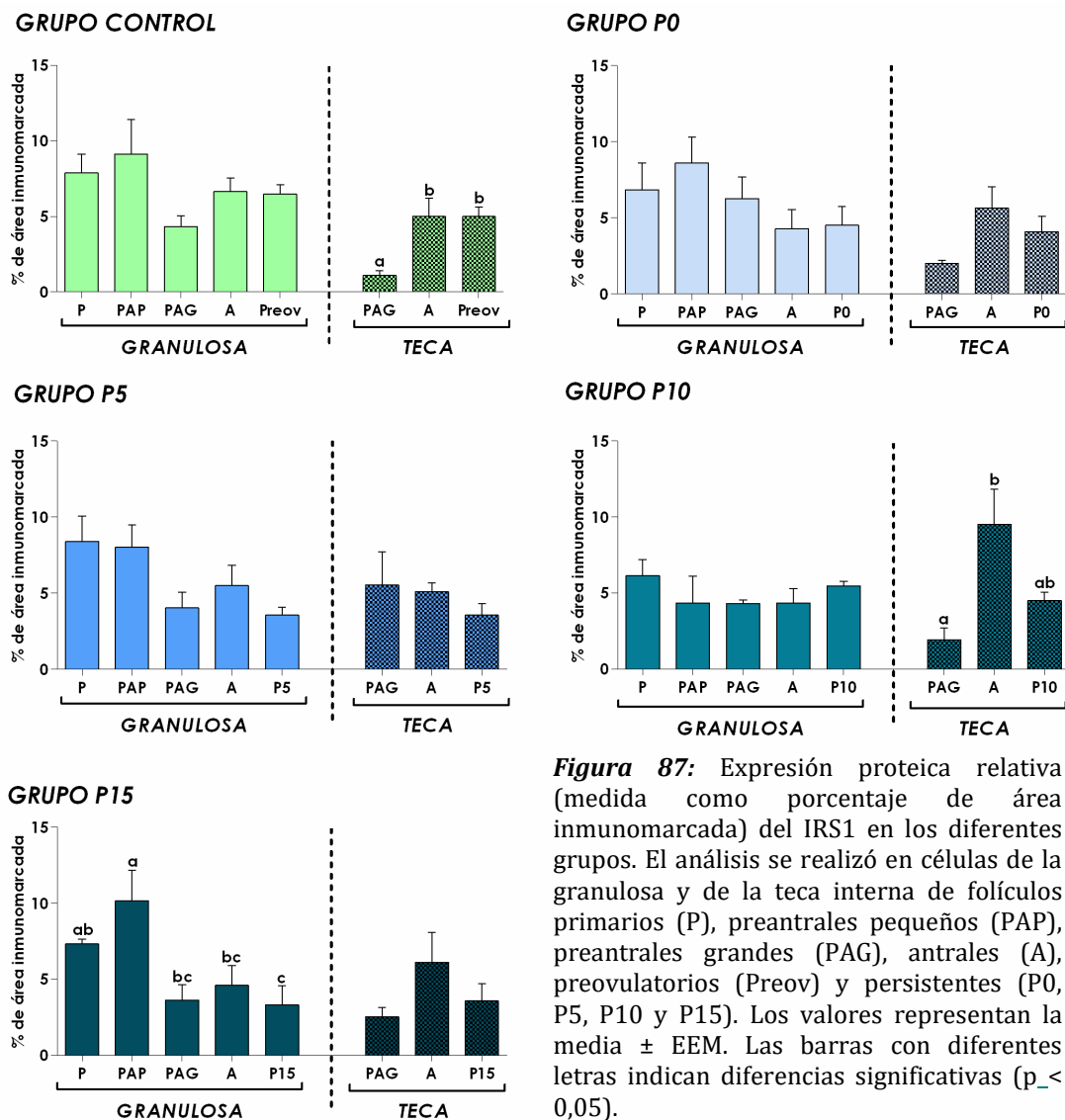


Figura 87: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del IRS1 en los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (P0, P5, P10 y P15). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

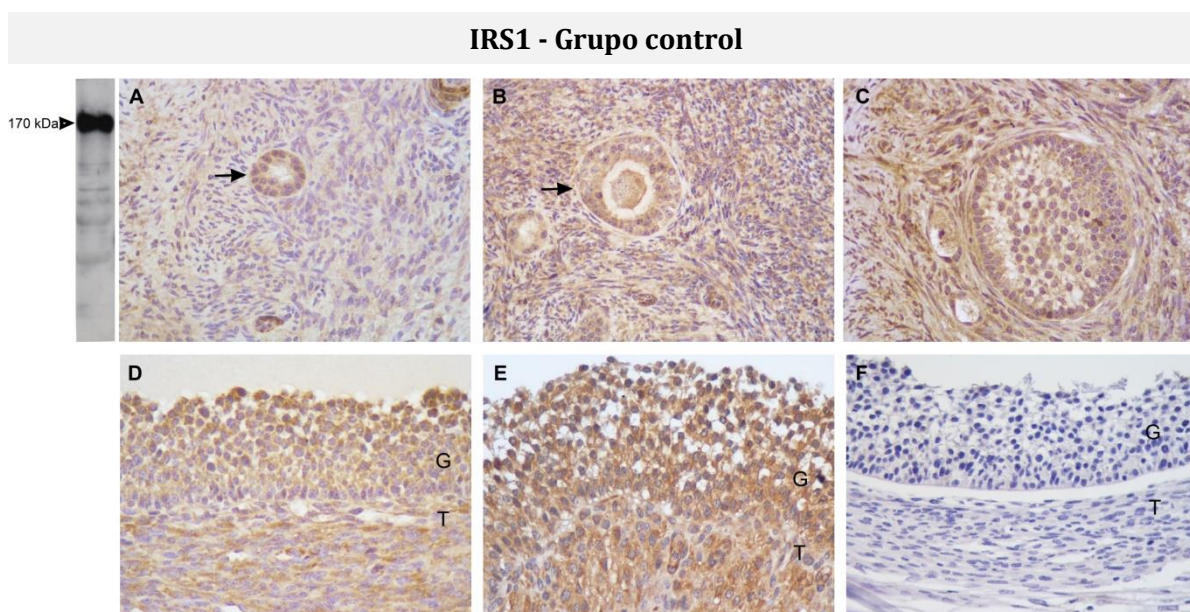


Figura 88: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo preovulatorio. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 170 KDa correspondientes a IRS. Magnificación 400 X.

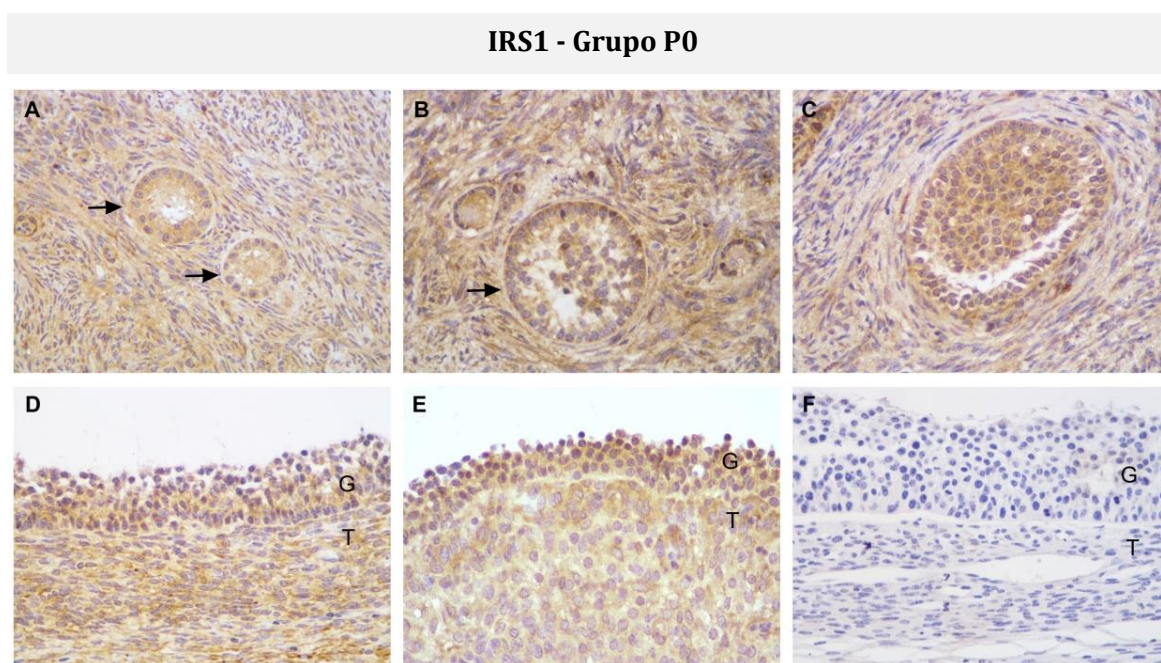


Figura 89: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P0. A) Folículos primarios. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

IRS1 - Grupo P5

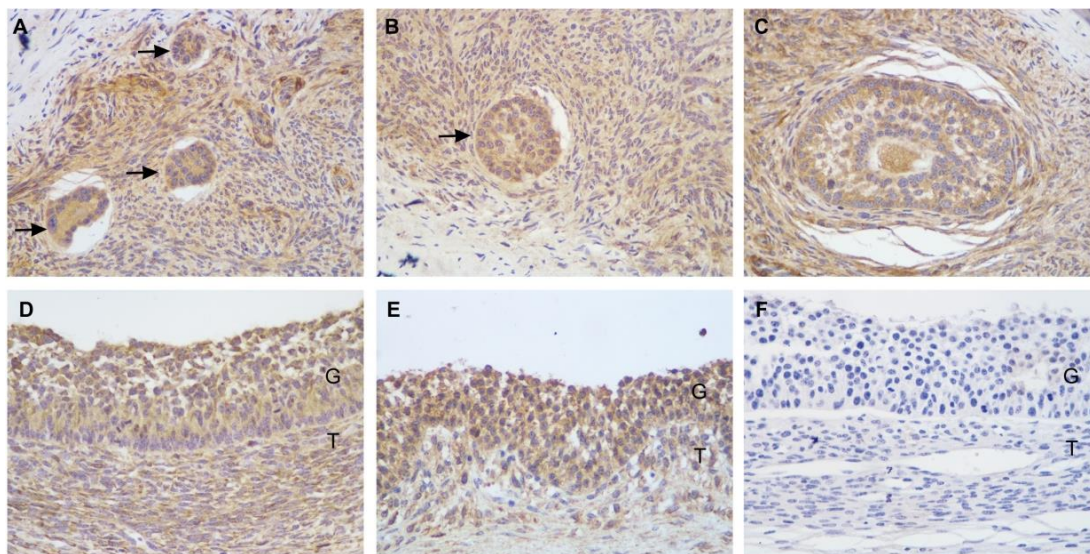


Figura 90: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P5. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

IRS1- Grupo P10

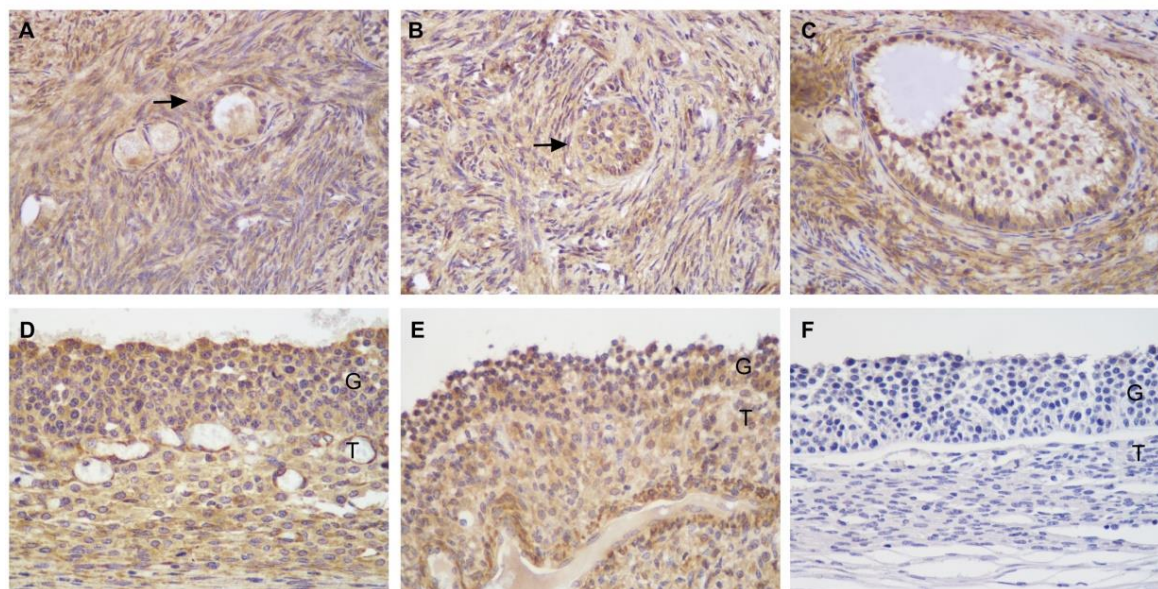
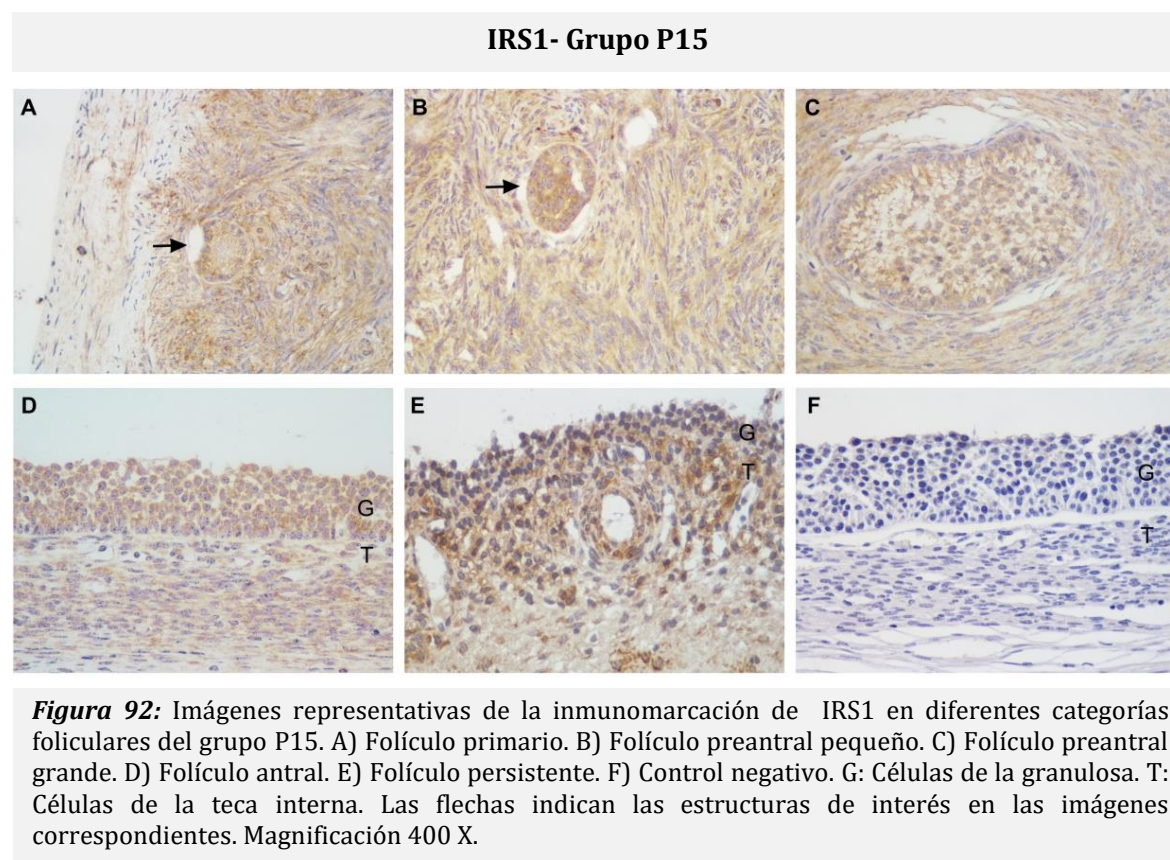


Figura 91: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P10. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.



4.3.2.3.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

Se realizó un análisis de la expresión en células de la granulosa y de la teca interna por categoría folicular entre los distintos grupos.

En células de la granulosa, la expresión proteica del IRS1 fue mayor en los folículos preovulatorios del grupo control respecto a los folículos persistentes de los grupos P5 y P15 ($p < 0,05$), sin diferencias con los folículos persistentes de los grupos P0 y P10 ($p > 0,05$) (Figuras 93 y 95).

En células de la teca, no se observaron diferencias entre grupos en las distintas categorías foliculares ($p > 0,05$) (Figuras 94 y 95).

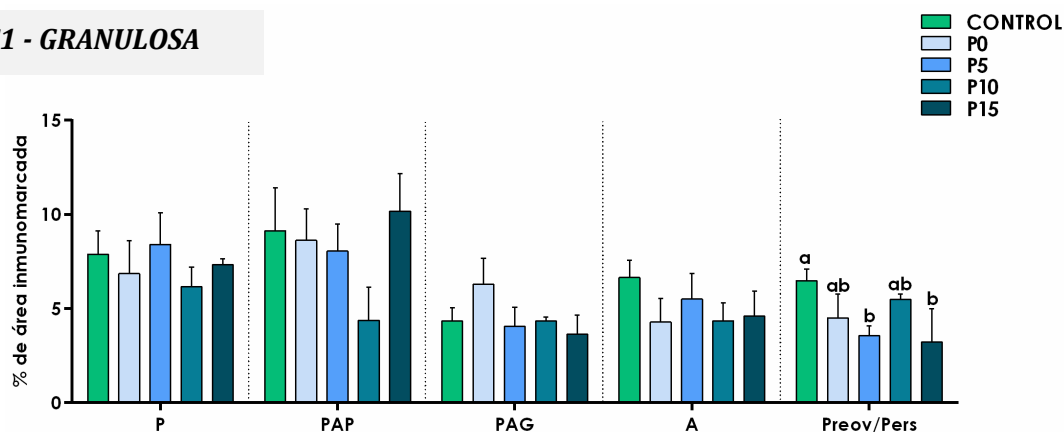
IRS1 - GRANULOSA

Figura 93: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del IRS1 en células de la granulosa de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

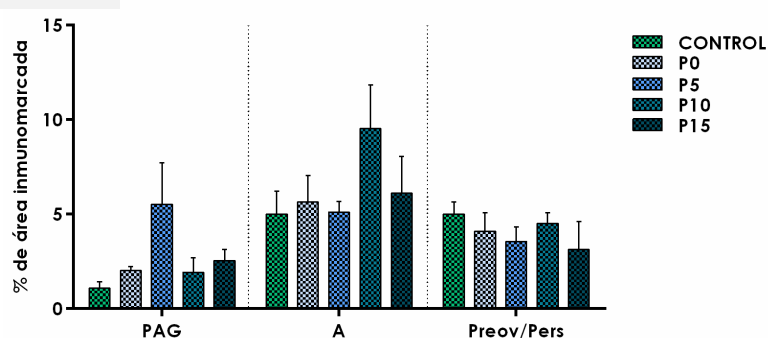
IRS1 - TECA

Figura 94: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del IRS1 en células de la teca de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la teca interna de folículos preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM.

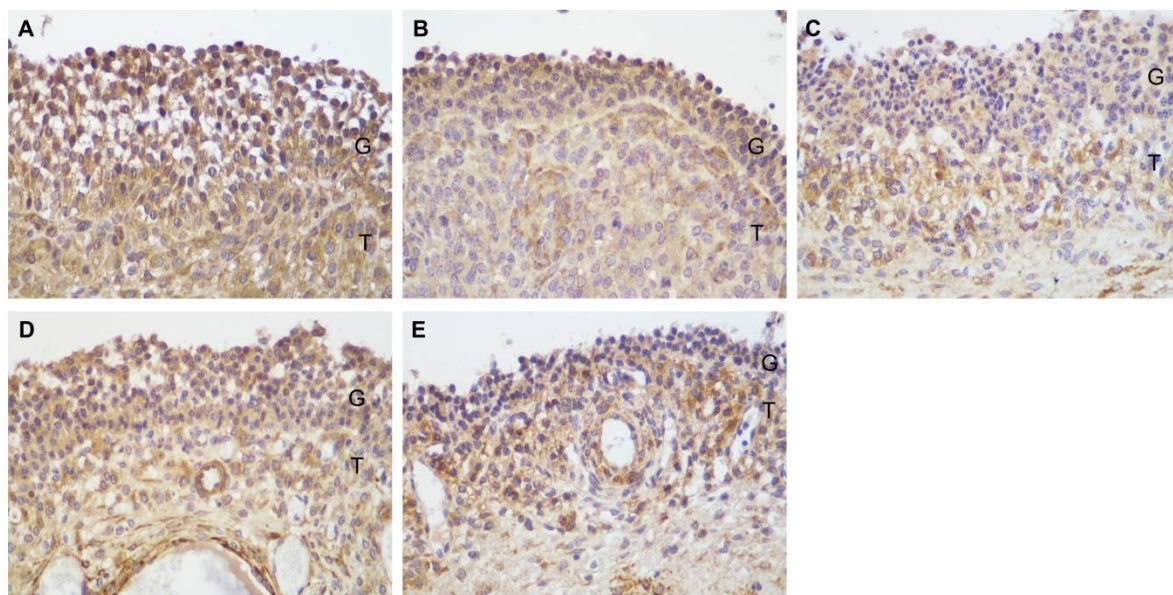


Figura 95: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IRS1 en los diferentes grupos. A) Folículo preovulatorio del grupo control. B) Folículo persistente del grupo P0. C) Folículo persistente del grupo P5. D) Folículo persistente del grupo P10. E) Folículo persistente del grupo P15. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Magnificación 400x.

4.3.2.4. Expresión proteica y localización del p-IRS1

El p-IRS1 (IRS1 fosforilado) fue localizado por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca de todos los folículos y grupos analizados (Figuras 97, 98, 99, 100, 101 y 104).

4.3.2.4.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

La expresión proteica del p-IRS1 en células de la granulosa del grupo control fue similar en las diferentes estructuras a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$). En las células de la teca determinamos una mayor expresión del p-IRS1 en los folículos dominantes respecto a los folículos antrales y preantrales grandes ($p < 0,05$) (Figuras 96 y 97).

En el grupo P0, la expresión proteica del p-IRS1 en ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) fue similar a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figuras 96 y 98).

En el grupo P5, la expresión proteica del p-IRS1 en las células de la granulosa fue mayor en los folículos preantrales pequeños, preantrales grandes y antrales, respecto a

los primarios y persistentes ($p < 0,05$). En las células de la teca no se observaron diferencias significativas a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figuras 96 y 99).

En el grupo P10, la expresión del p-IRS1 en las células de la granulosa fue mayor en los folículos preantrales pequeños respecto a los folículos primarios, antrales y persistentes ($p < 0,05$), sin diferencias con los folículos preantrales grandes ($p > 0,05$). En las células de la teca la expresión del p-IRS1 fue similar a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figura 96 y 100).

En el grupo P15, la expresión proteica del p-IRS1 en ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) fue similar a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figuras 96 y 101).

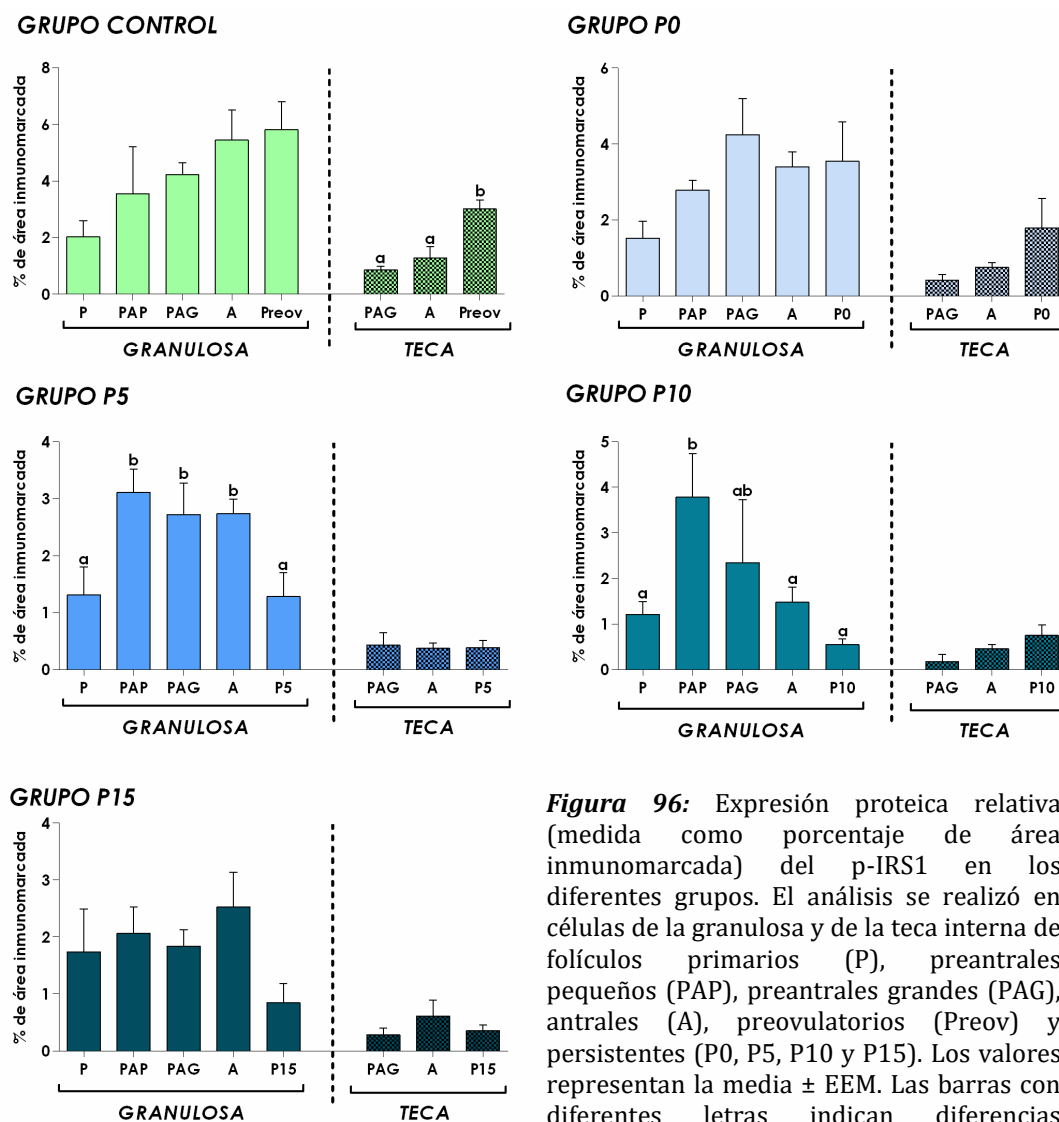


Figura 96: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-IRS1 en los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (P0, P5, P10 y P15). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

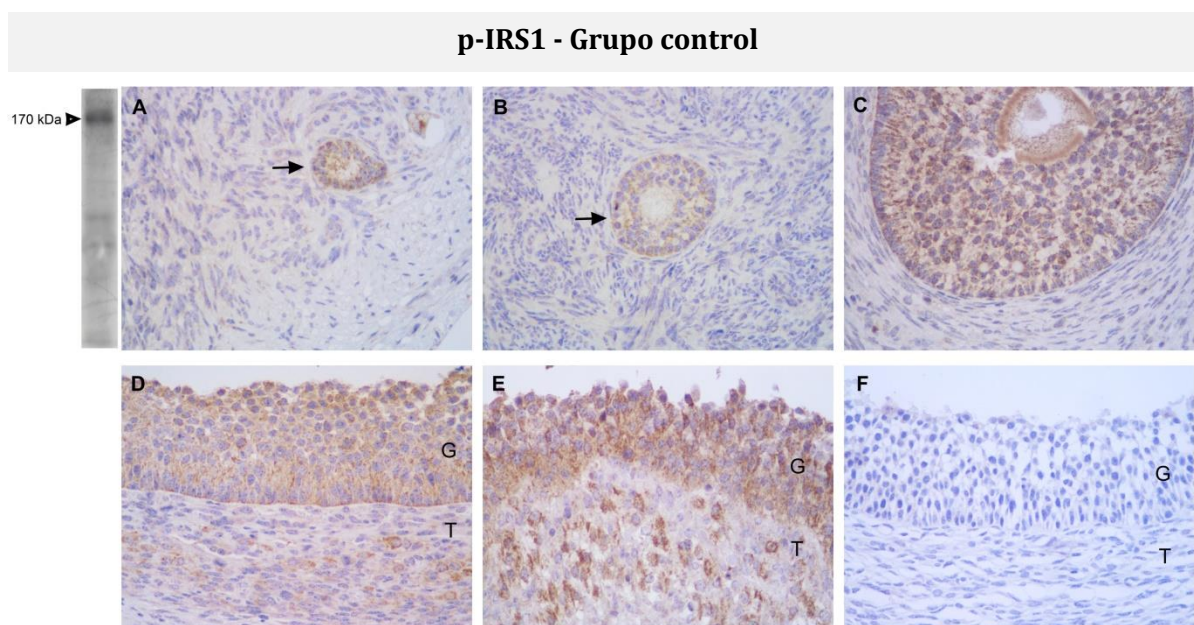


Figura 97: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo preovulatorio. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 170 KDa correspondientes a p-IRS1. Magnificación 400 X.

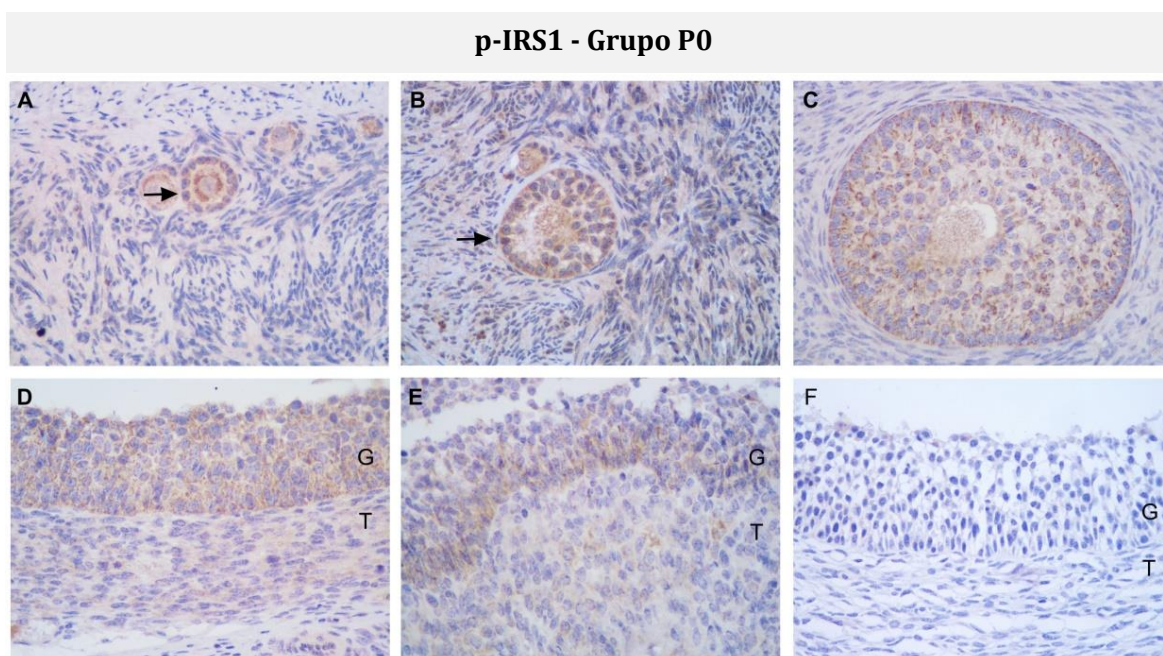


Figura 98: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P0. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

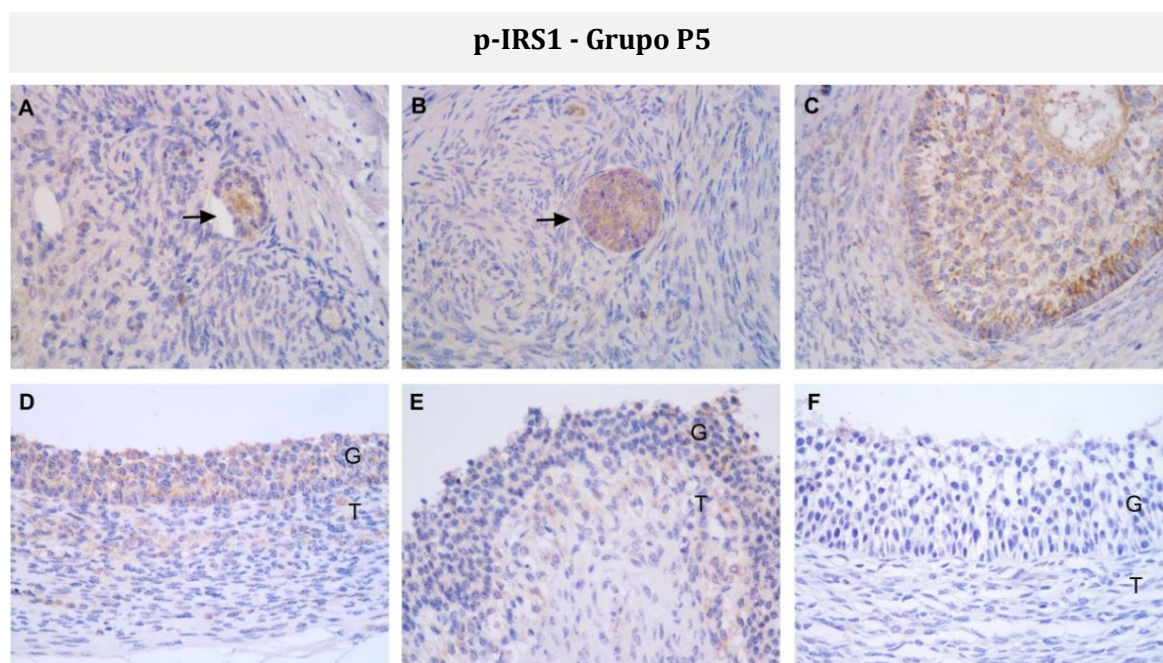


Figura 99: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P5. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

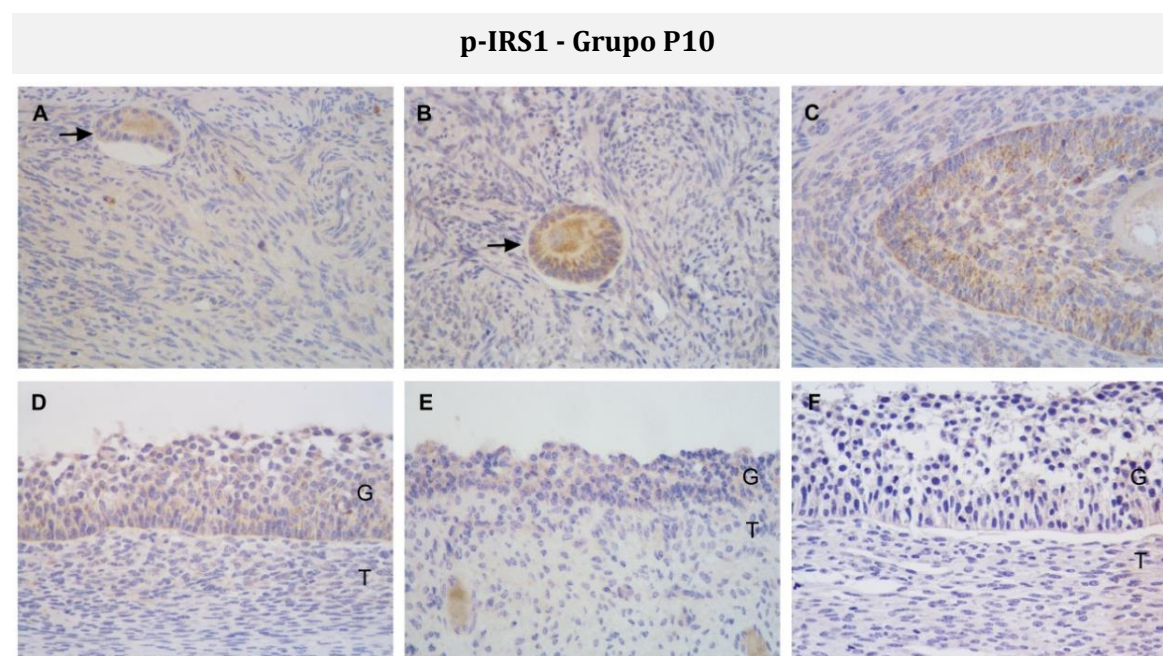


Figura 100: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P10. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

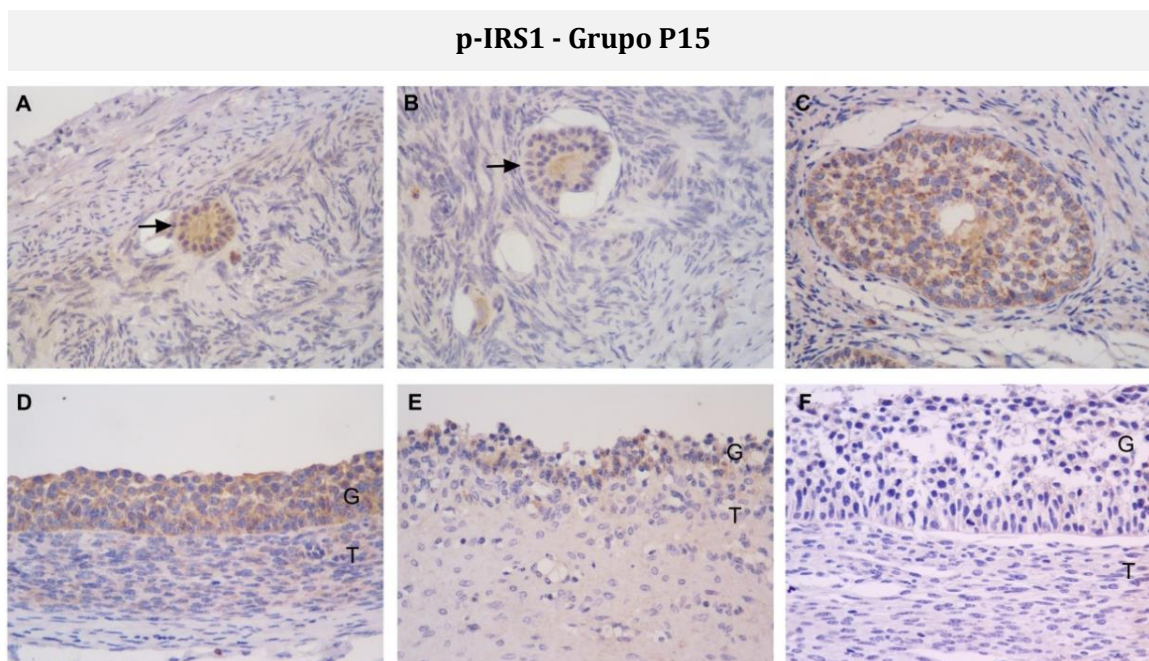


Figura 101: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS1 en diferentes categorías foliculares del grupo P15. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

4.3.2.4.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

Se realizó un análisis de la expresión en células de la granulosa y de la teca interna por categoría folicular entre los distintos grupos.

En células de la granulosa, la expresión proteica del p-IRS1 fue mayor en los folículos antrales del grupo control respecto a los folículos persistentes de los grupos P5, P10 y P15 ($p < 0,05$), sin diferencias con los folículos persistentes del grupo P0 ($p > 0,05$). Además se determinó una mayor expresión proteica en los folículos preovulatorios del grupo control respecto a los folículos persistentes de los grupos P5, P10 y P15 ($p < 0,05$), sin diferencias con el grupo P0 ($p > 0,05$) (Figuras 102 y 104).

En las células de la teca, la expresión proteica de p-IRS1 fue mayor en los folículos preovulatorios del grupo control respecto a todos los folículos persistente ($p < 0,05$) (Figuras 103 y 104).

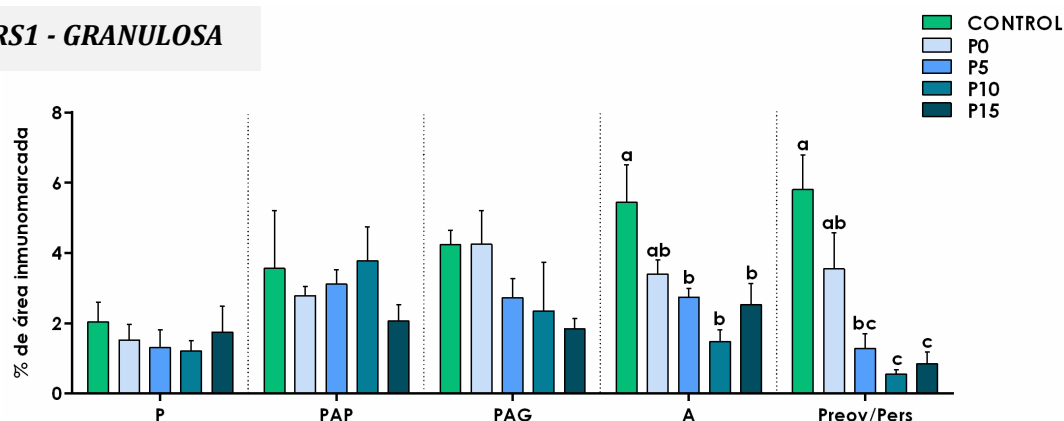
p-IRS1 - GRANULOSA

Figura 102: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-IRS1 en células de la granulosa de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

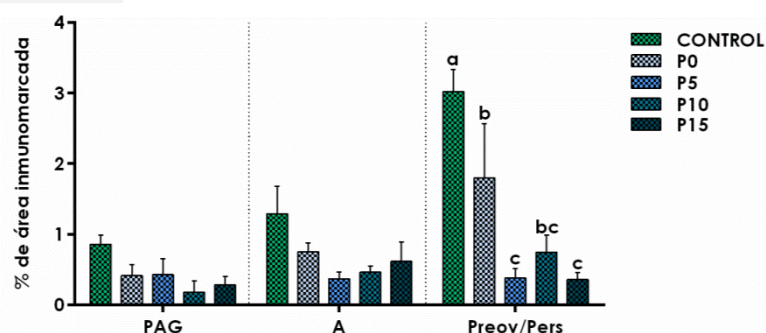
p-IRS1 - TECA

Figura 103: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-IRS1 en células de la teca de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la teca interna de folículos preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

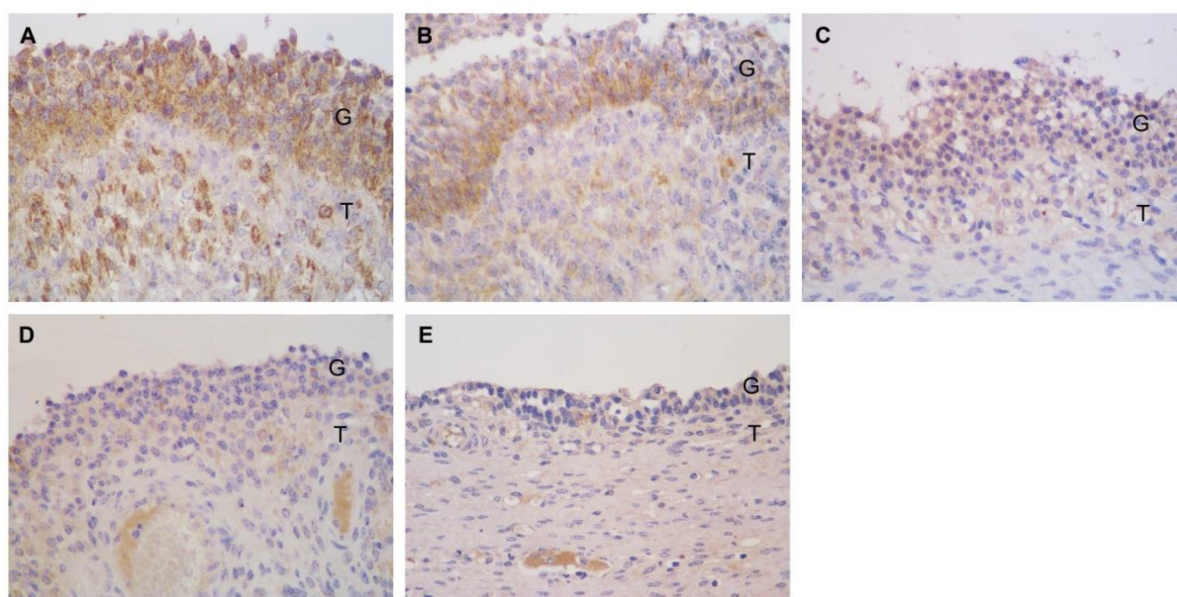


Figura 104: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-IRS1 en los diferentes grupos. A) Folículo preovulatorio del grupo control. B) Folículo persistente del grupo P0. C) Folículo persistente del grupo P5. D) Folículo persistente del grupo P10. E) Folículo persistente del grupo P15. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Magnificación 400x.

4.3.2.5. Expresión proteica y localización de la PI3K

La PI3K fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca de todos los folículos y grupos analizados (Figuras 106, 107, 108, 109, 110 y 113).

4.3.2.5.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

En el grupo control, la expresión proteica de la PI3K en las células de la granulosa fue mayor en los folículos preovulatorios respecto a las demás categorías foliculares ($p < 0,05$). En las células de la teca determinamos una mayor expresión de la PI3K en los folículos preovulatorios respecto a los folículos antrales y preantrales grandes ($p < 0,05$) (Figuras 105 y 106x).

En los grupos P0, P5 y P10 la expresión proteica de la PI3K en ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) fue similar a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figuras 105, 107, 108 y 109).

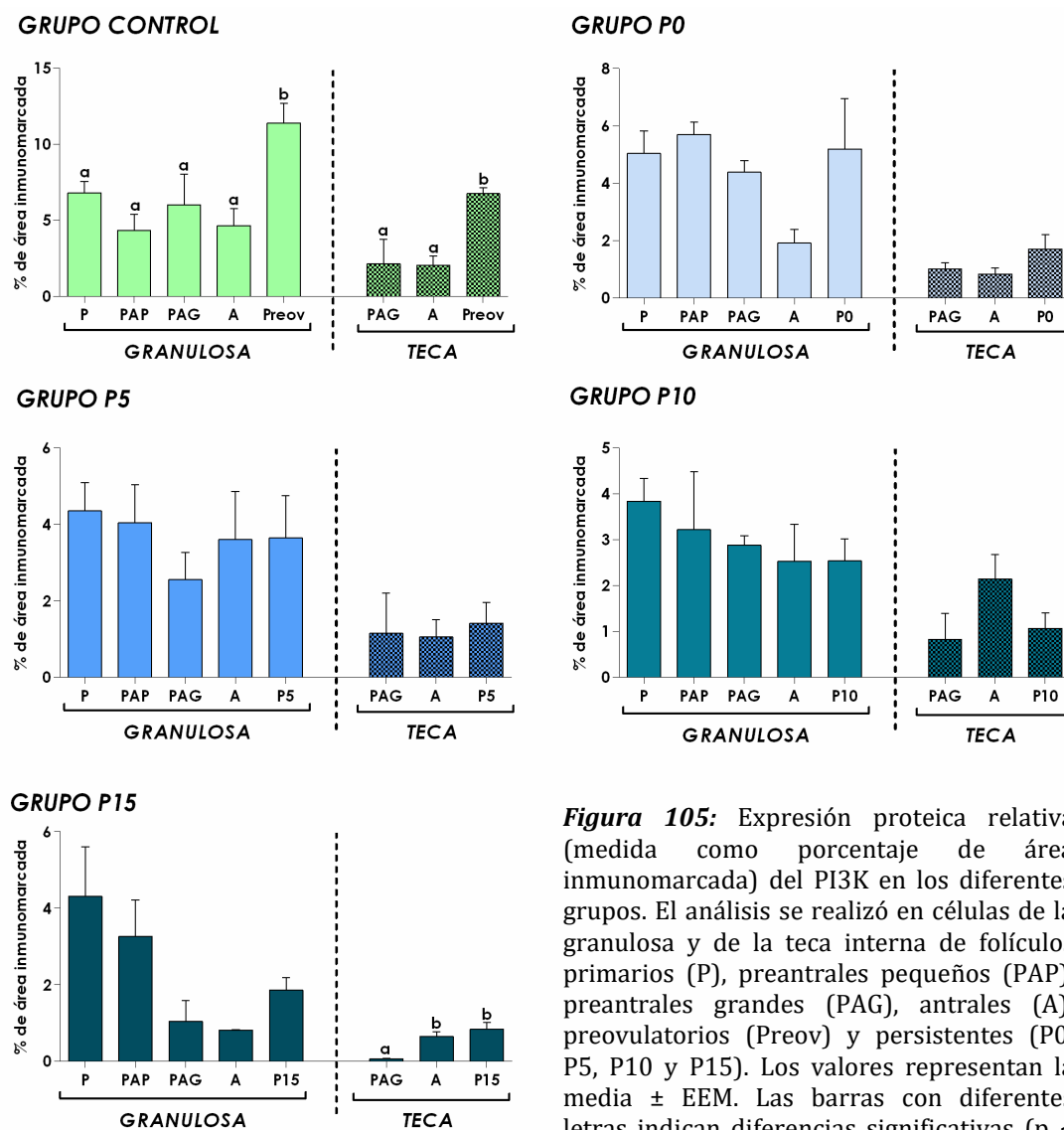


Figura 105: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del PI3K en los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (P0, P5, P10 y P15). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo P15, la expresión proteica de la PI3K fue similar a lo largo de la foliculogénesis en las células de la granulosa ($p > 0,05$). En las células de la teca, su expresión fue mayor en los folículos antrales y persistentes respecto a los folículos preantrales grandes ($p < 0,05$) (Figuras 105 y 110).

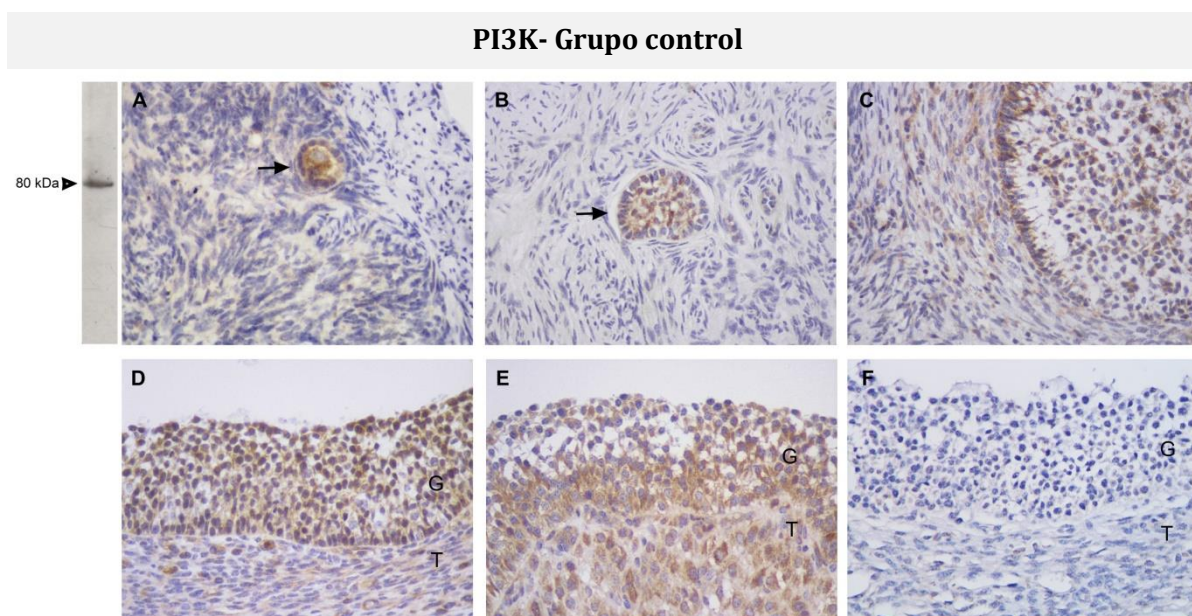


Figura 106: Imágenes representativas de la inmunomarcación de PI3K en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo preovulatorio. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 80 KDa correspondientes a PI3K. Magnificación 400 X.

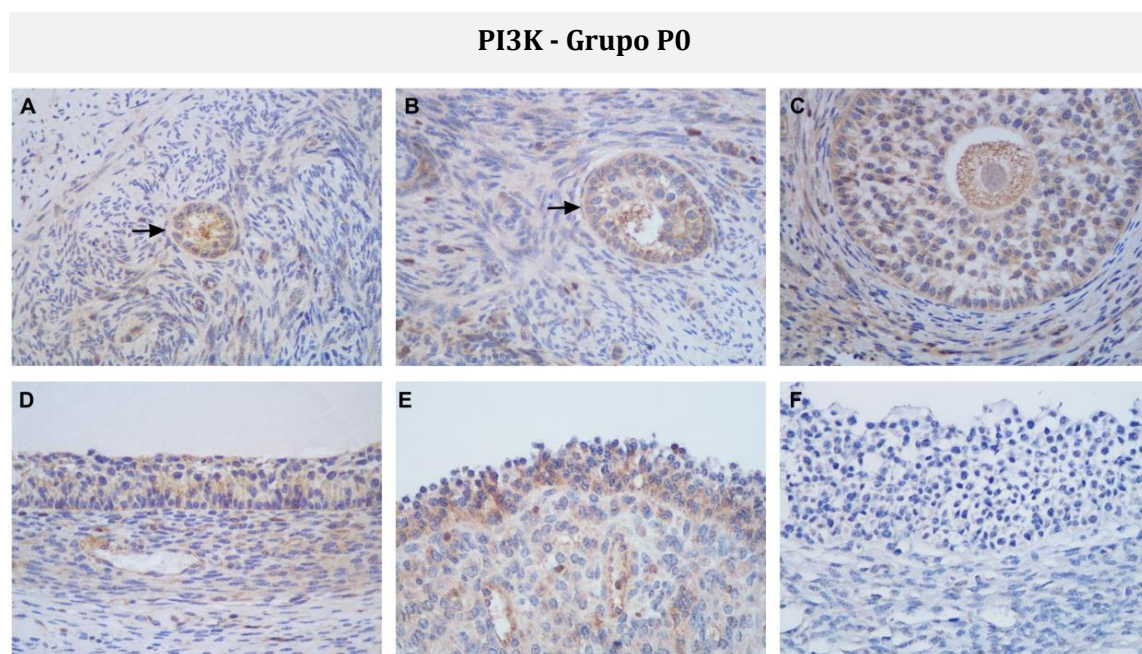
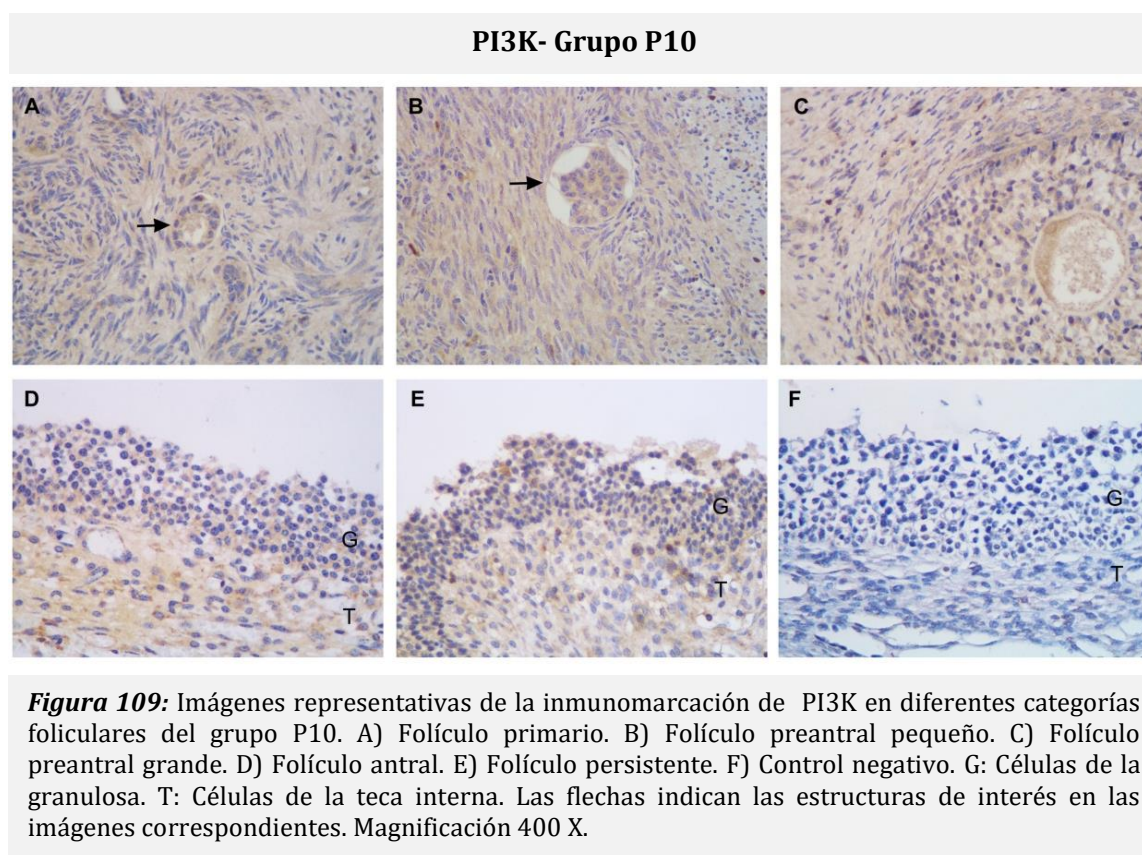
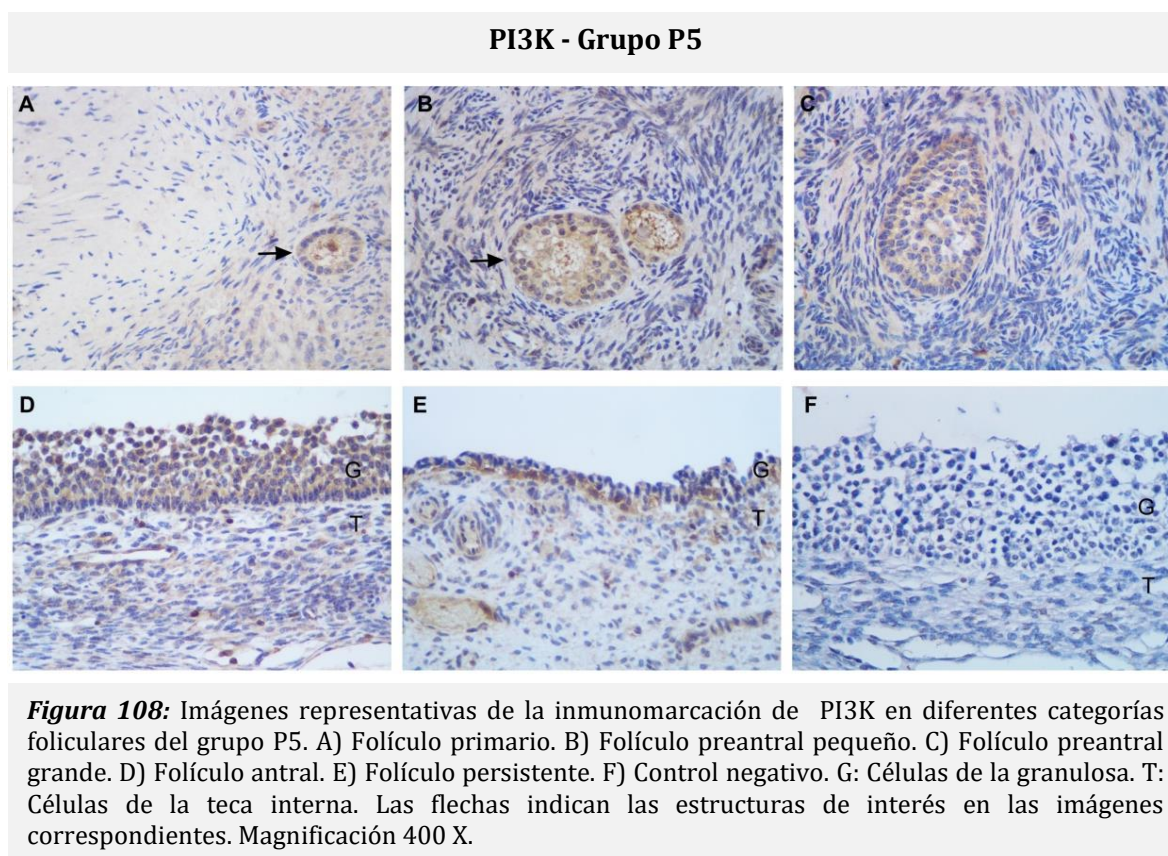
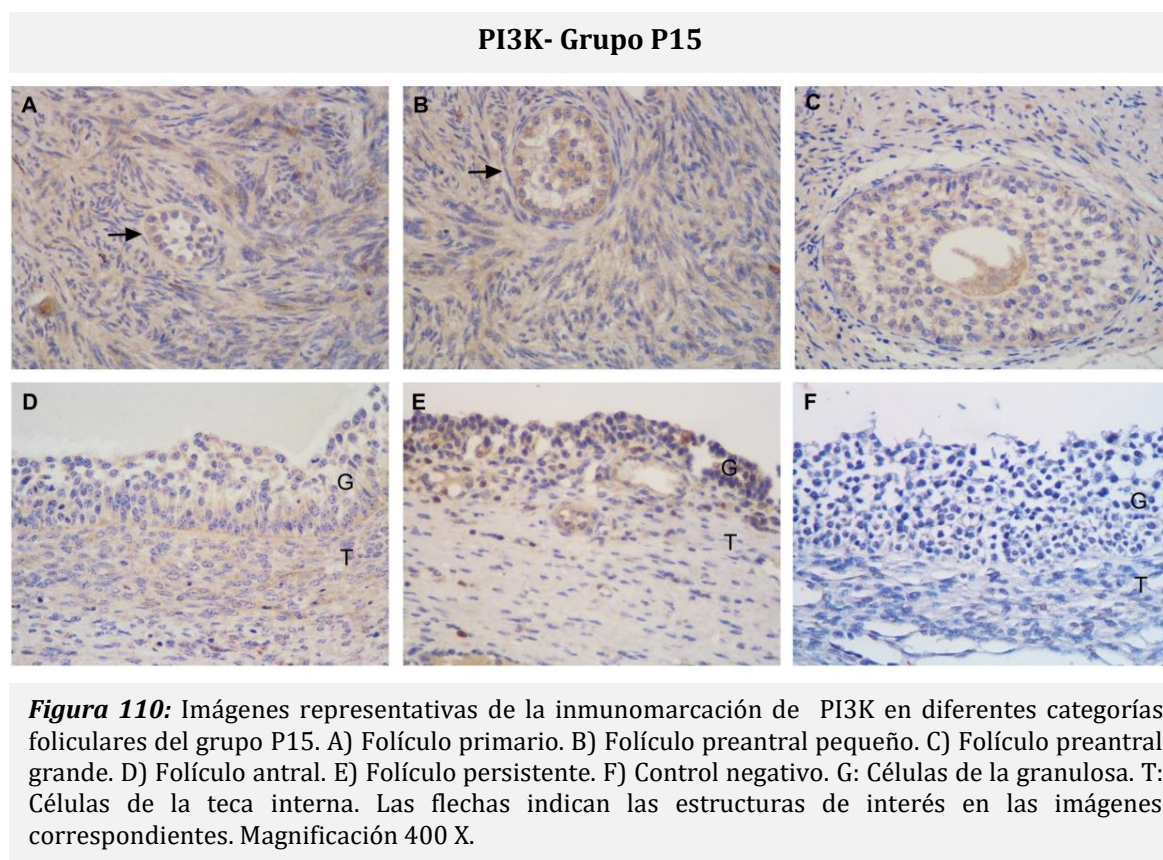


Figura 107: Imágenes representativas de la inmunomarcación de PI3K en diferentes categorías foliculares del grupo P0. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.





4.3.2.5.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

Se realizó un análisis de la expresión en células de la granulosa y de la teca interna por categoría folicular entre los distintos grupos.

En células de la granulosa, la expresión proteica de la PI3K fue mayor en los folículos preantrales grandes del grupo control respecto a los folículos preantrales de los grupos P5 y P15 ($p < 0,05$), sin diferencias con los grupos P0 y P10 ($p > 0,05$). Por otro lado, la expresión proteica de la PI3K fue mayor en los folículos preovulatorios del grupo control respecto a los folículos persistentes de todos los grupos (P0, P5, P10 y P15) ($p < 0,05$) (Figuras 111 y 113).

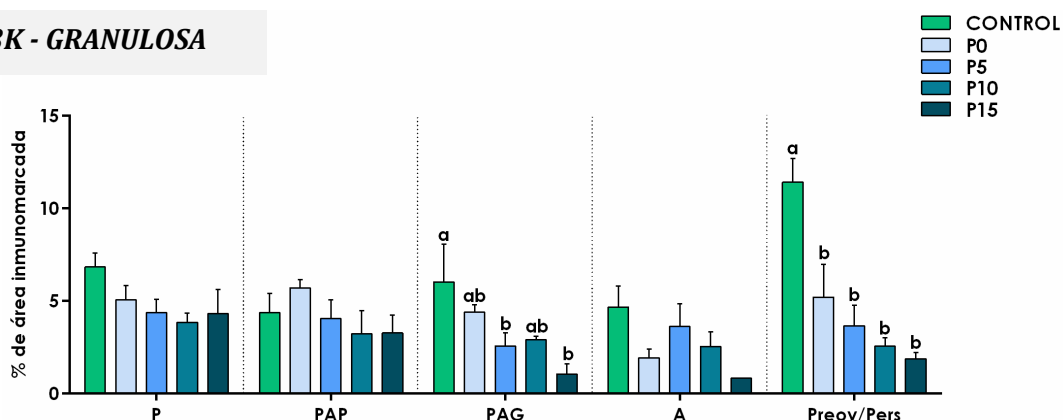
PI3K - GRANULOSA

Figura 111: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del PI3K en células de la granulosa de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

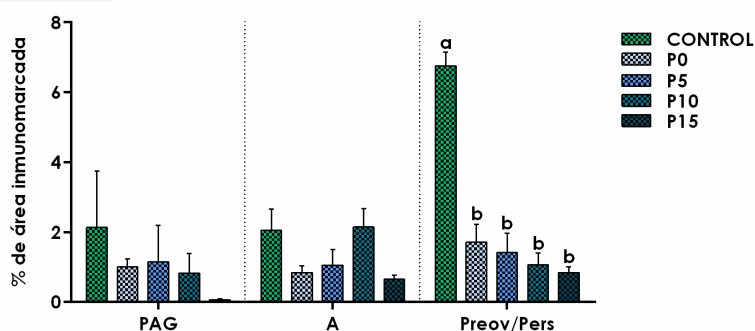
PI3K - TECA

Figura 112: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del PI3K en células de la teca de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la teca interna de folículos preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

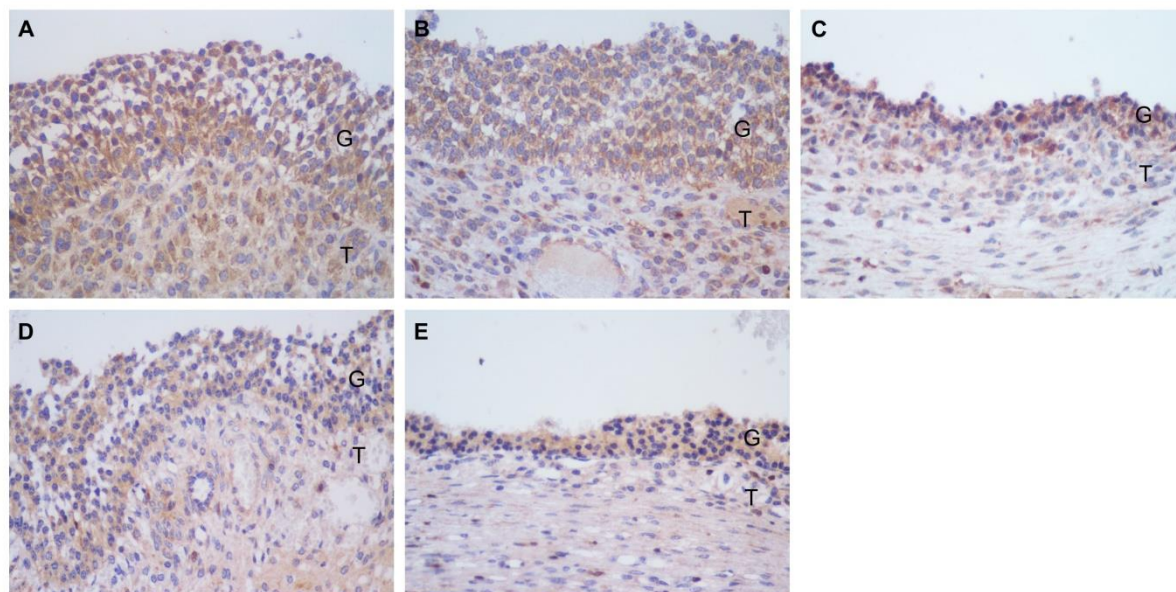


Figura 113: Imágenes representativas de la inmunomarcación de PI3K en los diferentes grupos. A) Folículo preovulatorio del grupo control. B) Folículo persistente del grupo P0. C) Folículo persistente del grupo P5. D) Folículo persistente del grupo P10. E) Folículo persistente del grupo P15. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Magnificación 400x.

4.3.2.6. Expresión proteica y localización de panAkt

El panAkt fue localizado por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca de todos los folículos y grupos analizados (Figuras 115, 116, 117, 118, 119 y 121).

4.3.2.6.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

La expresión proteica del panAkt en células de la granulosa del grupo control fue similar en las diferentes estructuras a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$). En las células de la teca se detectó una mayor expresión del panAkt en los folículos antrales y preovulatorios respecto a los folículos preantrales grandes ($p < 0,05$) (Figuras 114 y 115).

La expresión proteica del panAkt en células de la granulosa del grupo P0 fue similar en las diferentes estructuras a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$). En las células de la teca se determinó una mayor expresión del panAkt en los folículos antrales

y persistentes respecto a los folículos preantrales grandes ($p < 0,05$) (Figuras 114 y 116).

En el grupo P5, la expresión proteica del panAkt en ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) fue similar a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figuras 114 y 117).

En el grupo P10, la expresión del panAkt en las células de la granulosa fue mayor en los folículos antrales y persistentes respecto a los folículos preantrales pequeños y grandes ($p < 0,05$), sin diferencias significativas con los folículos primarios ($p > 0,05$) (Figuras 114 y 118).

En el grupo P15, la expresión proteica del panAkt en ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) fue similar a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figuras 114 y 119).

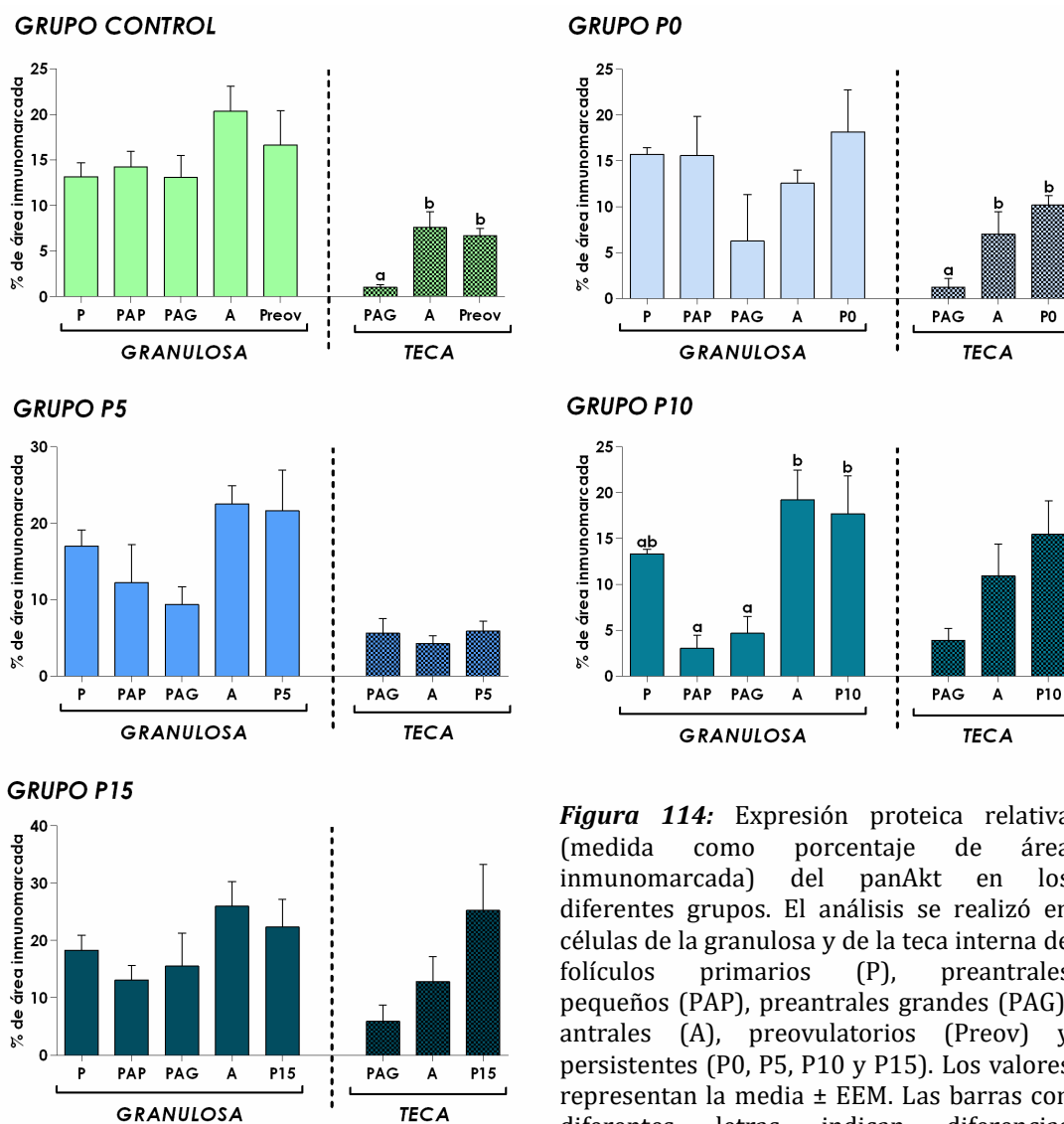


Figura 114: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del panAkt en los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (P0, P5, P10 y P15). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

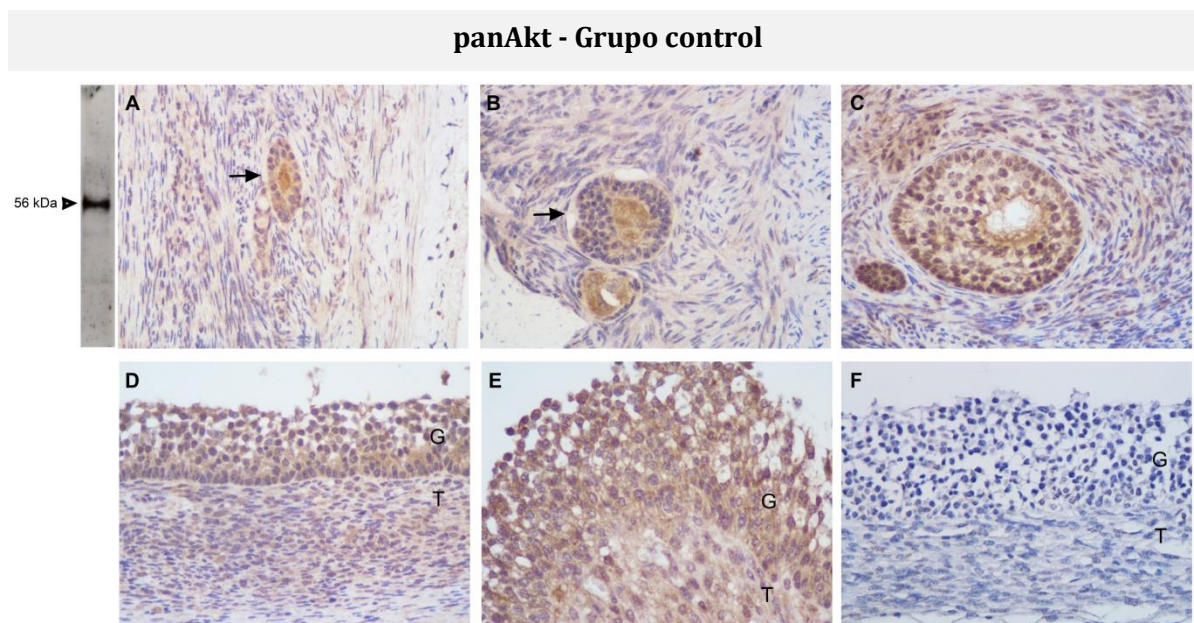


Figura 115: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo preovulatorio. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 56 KDa correspondientes a panAkt. Magnificación 400 X.

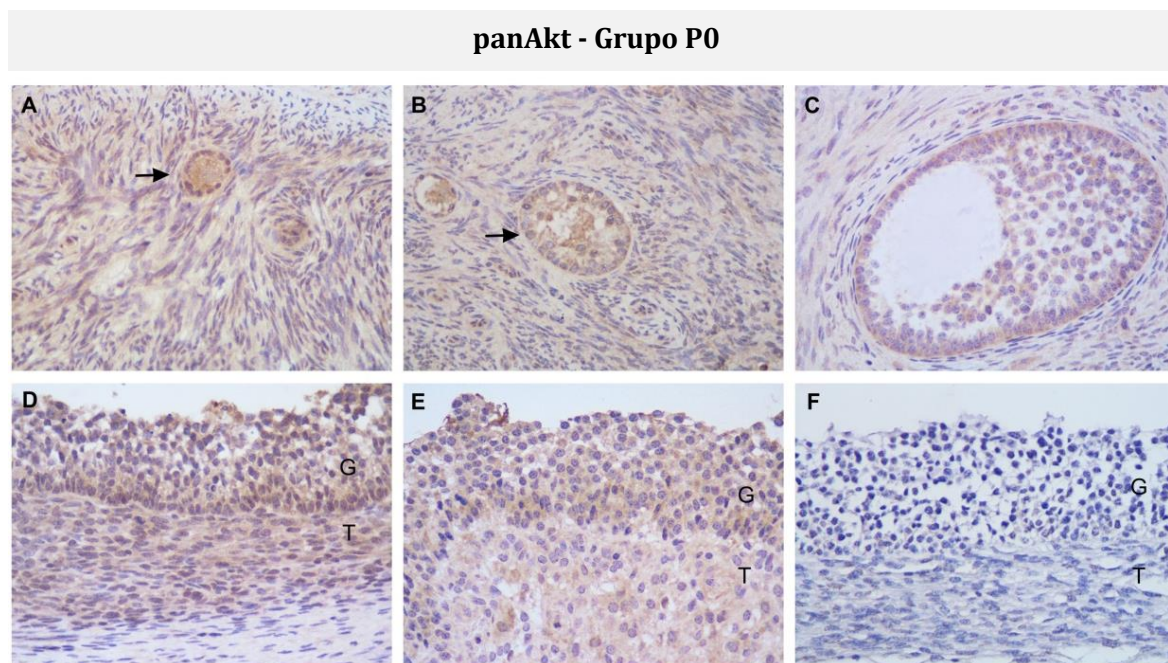


Figura 116: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P0. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

panAkt - Grupo P5

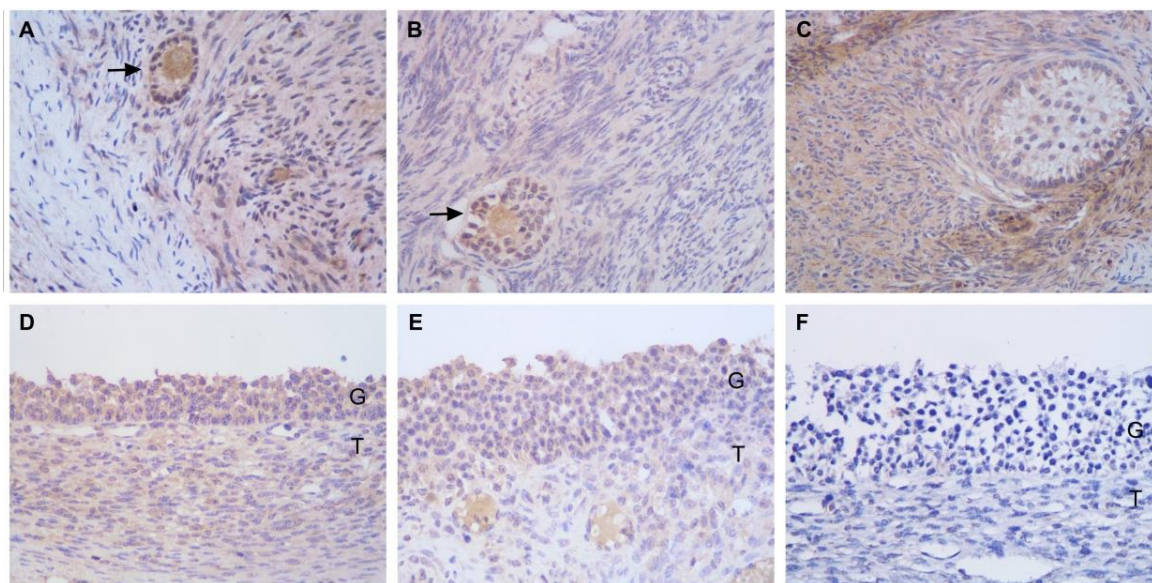


Figura 117: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P5. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

panAkt - Grupo P10

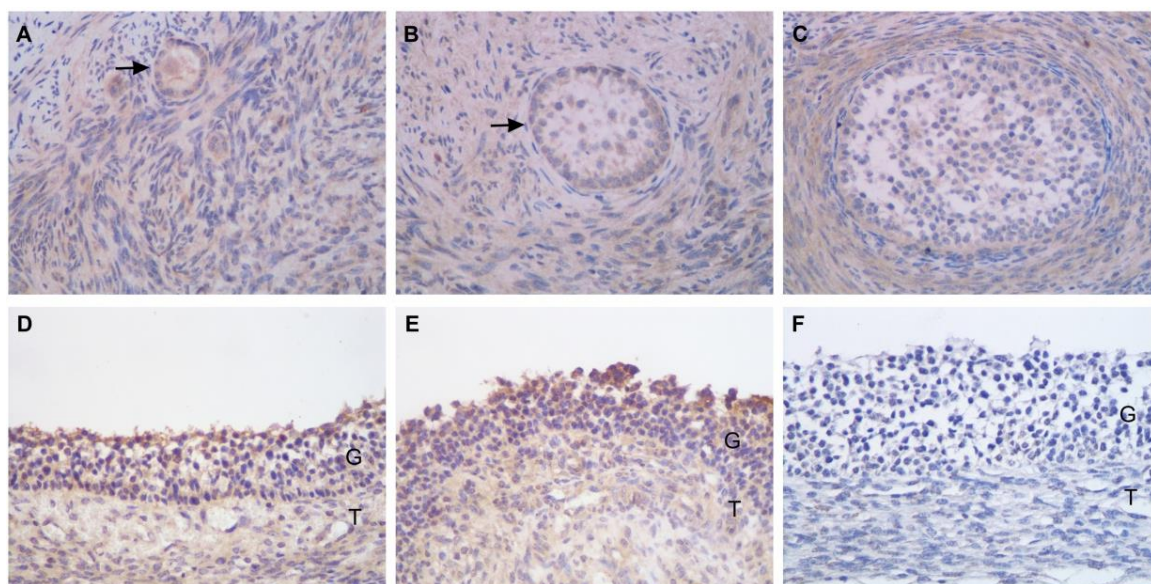
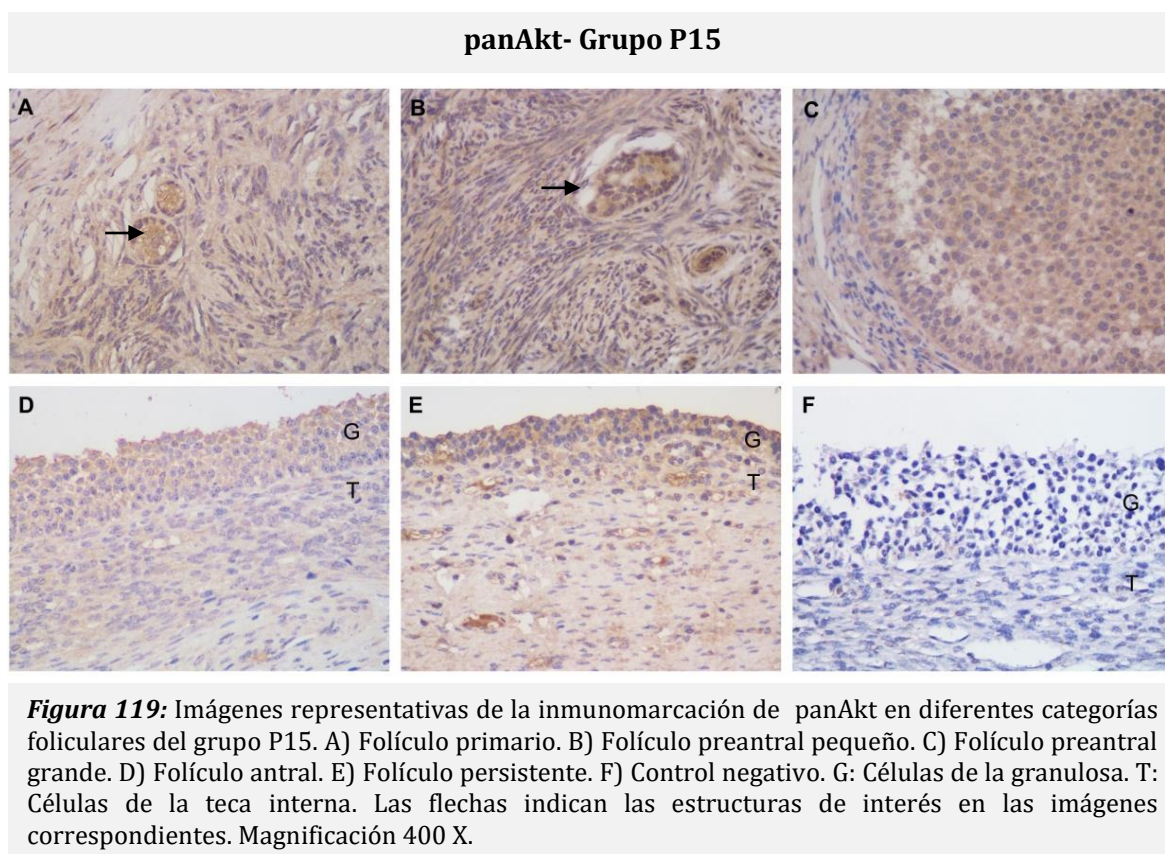


Figura 118: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P10. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.



4.3.2.6.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

Se realizó un análisis de la expresión en células de la granulosa y de la teca interna por categoría folicular entre los distintos grupos.

En células de la granulosa y de la teca, la expresión proteica del panAkt fue similar en todos los grupos y categorías analizadas ($p > 0,05$) (Figuras 120, 121 y 122).

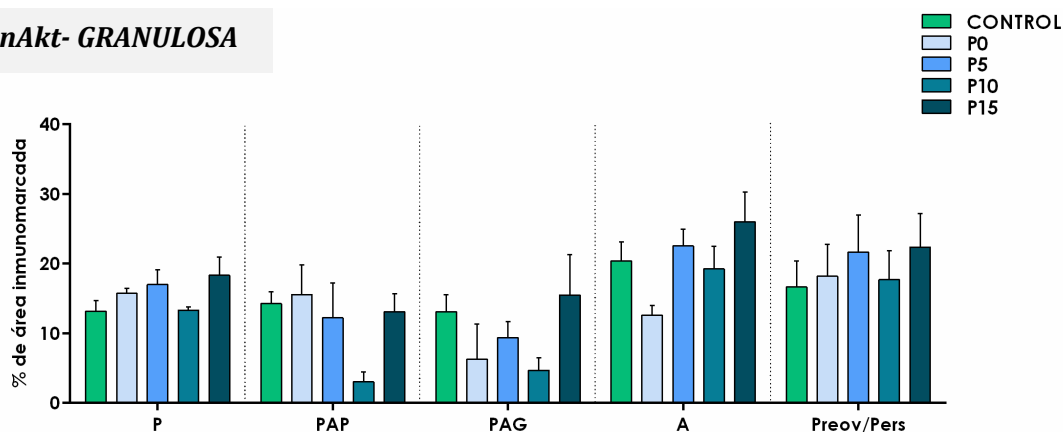
panAkt- GRANULOSA

Figura 120: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del panAkt en células de la granulosa de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM.

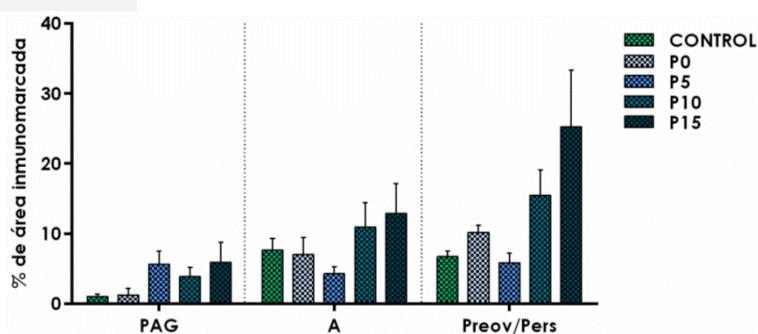
panAkt - TECA

Figura 121: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del panAkt en células de la teca de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la teca interna de folículos preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM.

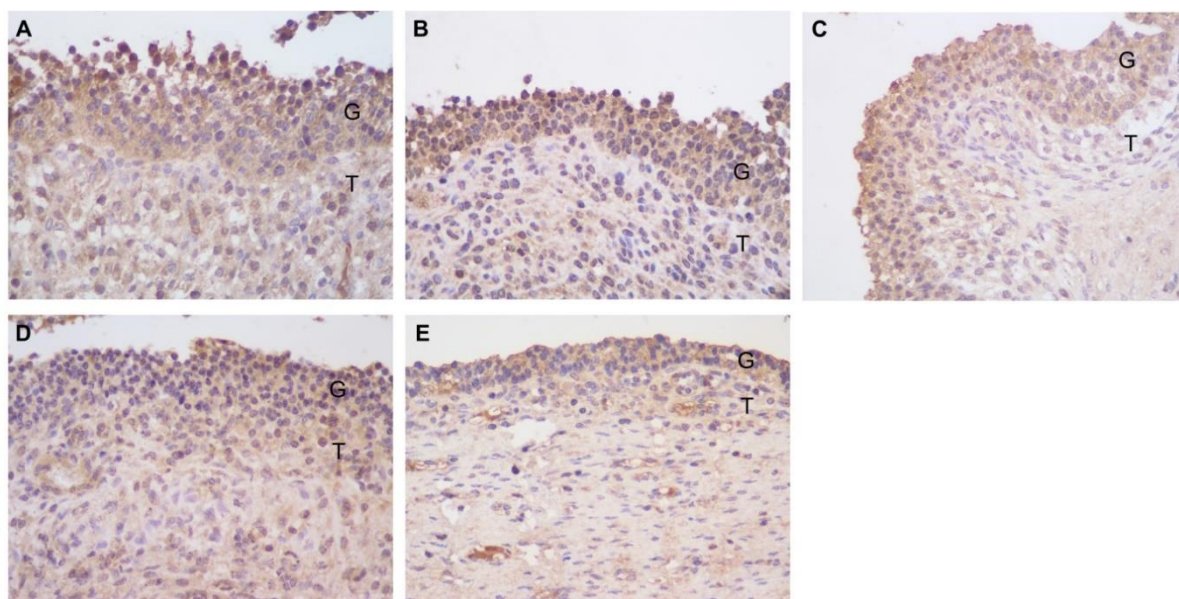


Figura 122: Imágenes representativas de la inmunomarcación de panAkt en los diferentes grupos. A) Folículo preovulatorio del grupo control. B) Folículo persistente del grupo P0. C) Folículo persistente del grupo P5. D) Folículo persistente del grupo P10. E) Folículo persistente del grupo P15. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Magnificación 400x.

4.3.2.7. Expresión proteica y localización del p-panAkt

El p-panAkt (panAkt fosforilado) fue localizado por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca de todos los folículos y grupos analizados (Figuras 124, 125, 125, 126, 127 y 130).

4.3.2.7.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

En el grupo control, la expresión proteica del p-panAkt en las células de la granulosa fue similar en todas las estructuras analizadas ($p > 0,05$). En las células de la teca la expresión fue mayor en los folículos preovulatorios respecto a los folículos preantrales grandes y antrales ($p < 0,05$) (Figuras 123 y 124).

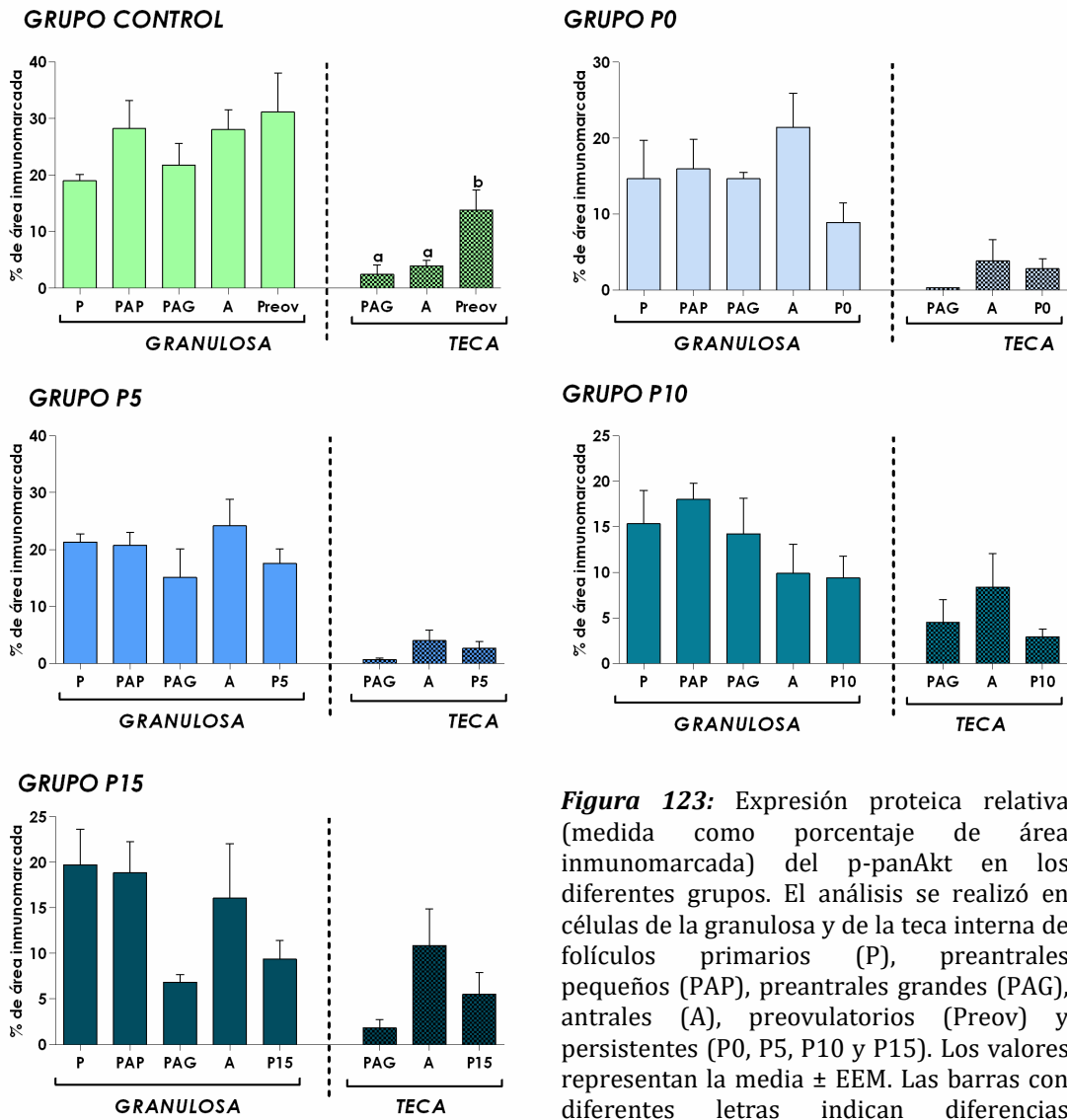


Figura 123: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-panAkt en los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (P0, P5, P10 y P15). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

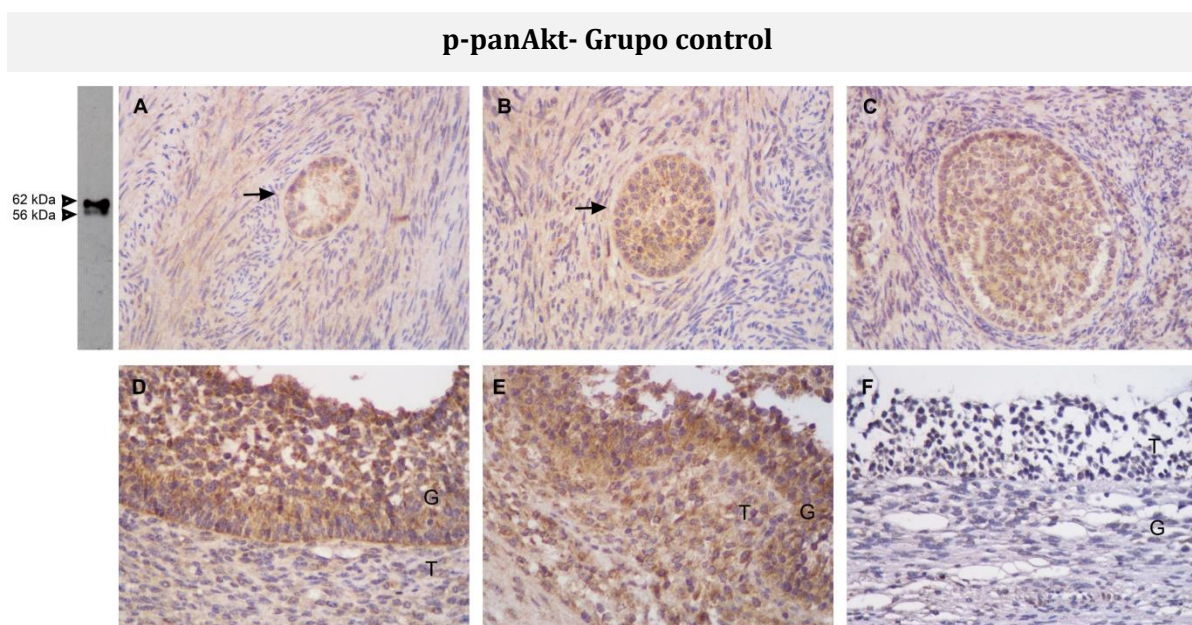


Figura 124: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo preovulatorio. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose dos bandas a la altura de 56 y 62 KDa correspondientes a p-panAkt. Magnificación 400X.

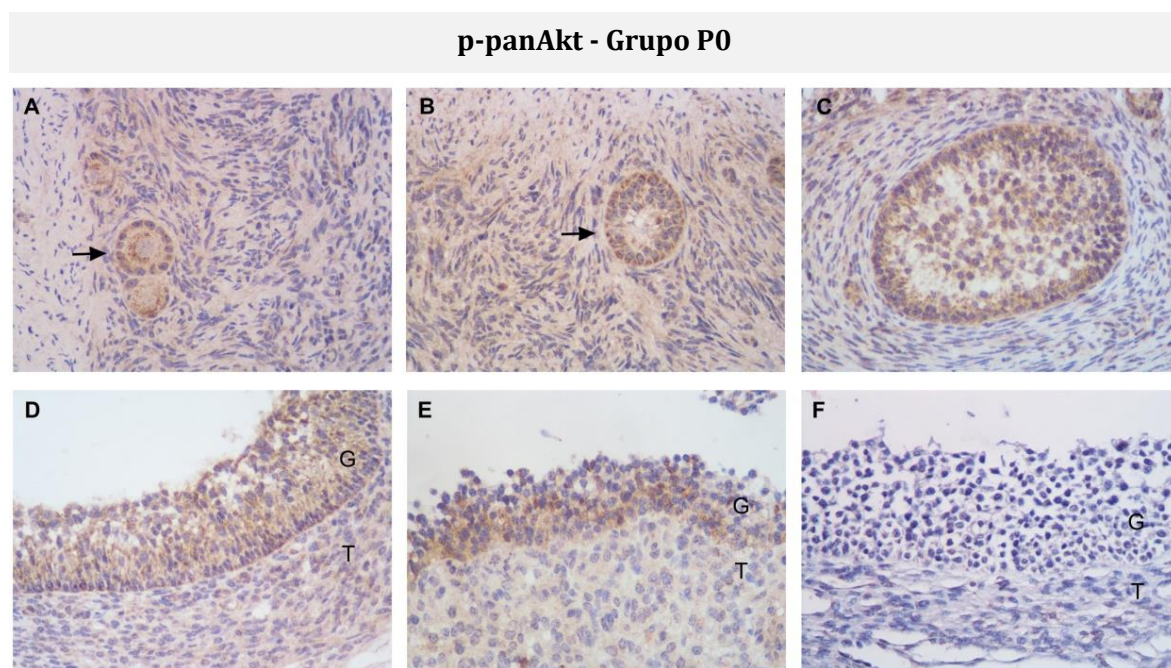


Figura 125: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P0. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

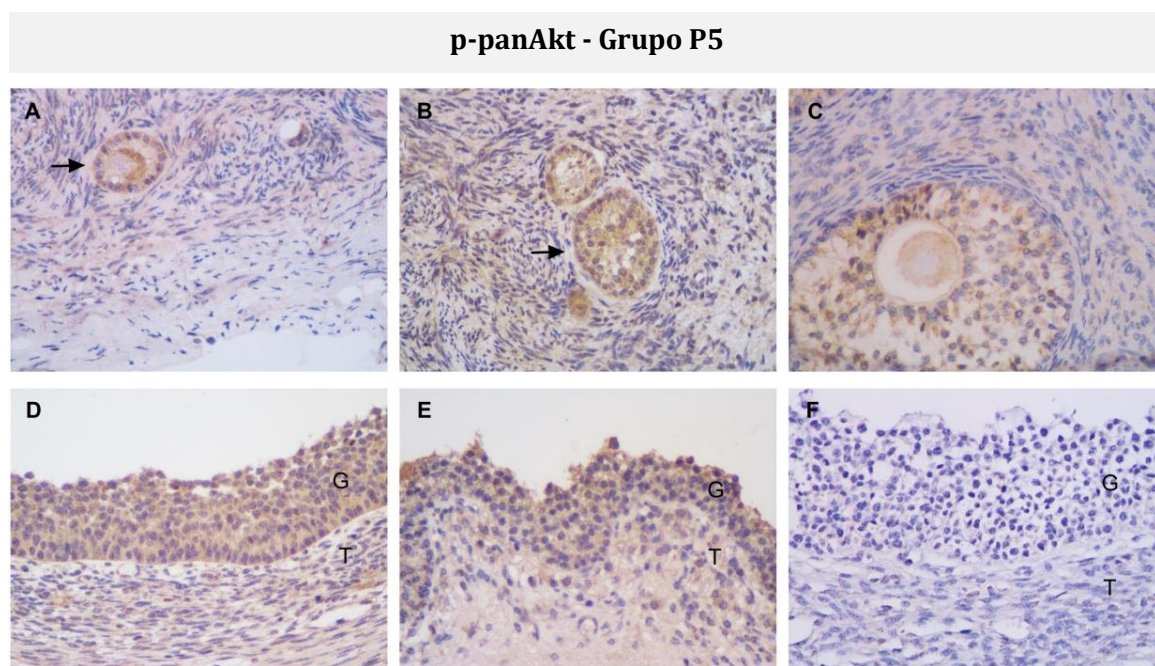


Figura 126: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P5. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

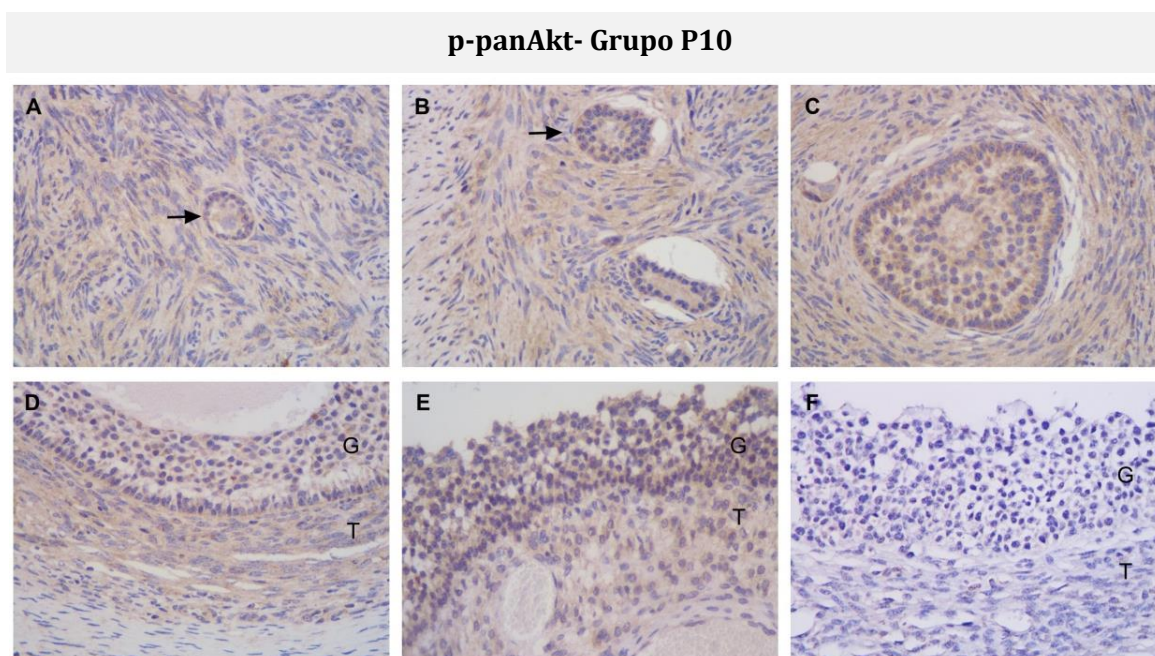


Figura 127: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P10. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

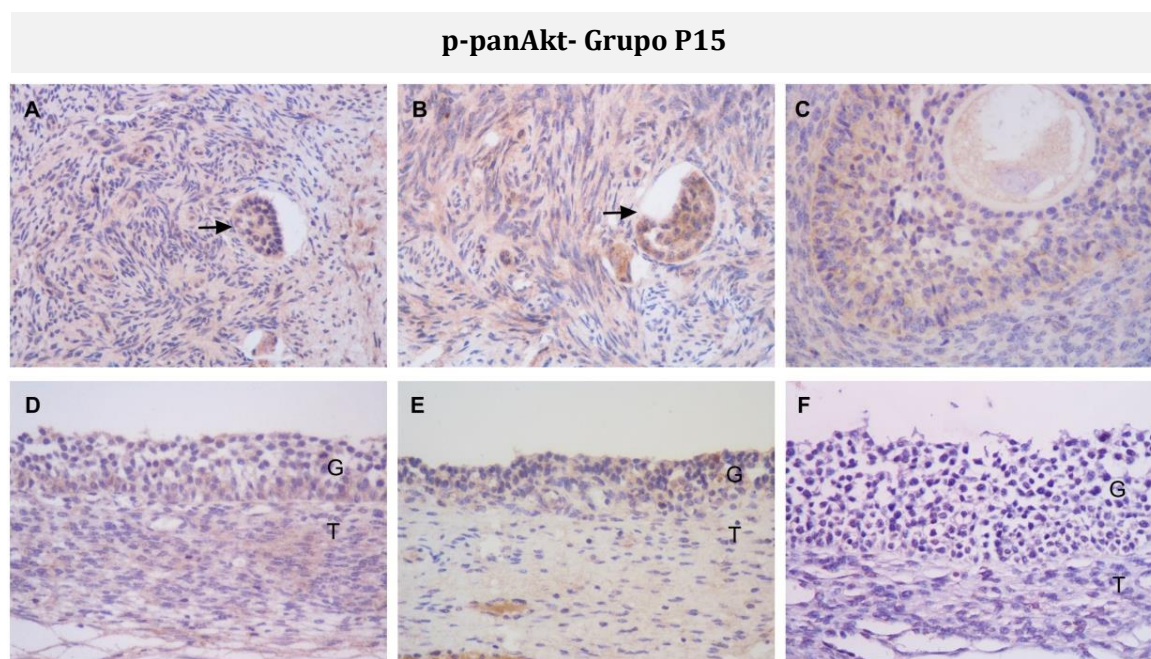


Figura 128: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-panAkt en diferentes categorías foliculares del grupo P15. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Folículo persistente. F) Control negativo. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

En los grupos P0, P5, P10 y P15, la expresión proteica del p-Akt en ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) fue similar a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$) (Figuras 123, 125, 126, 127 y 128).

4.3.2.7.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

Se realizó un análisis de la expresión en células de la granulosa y de la teca interna por categoría folicular entre los distintos grupos.

En células de la granulosa y de la teca, la expresión proteica del p-Akt fue mayor en los folículos preovulatorios del grupo control respecto a los folículos persistentes de todos los grupos (P0, P5, P10 y P15) ($p < 0,05$). En las demás categorías foliculares analizadas no se encontraron diferencias entre los diversos grupos ($p > 0,05$) (Figuras 129, 130 y 131).

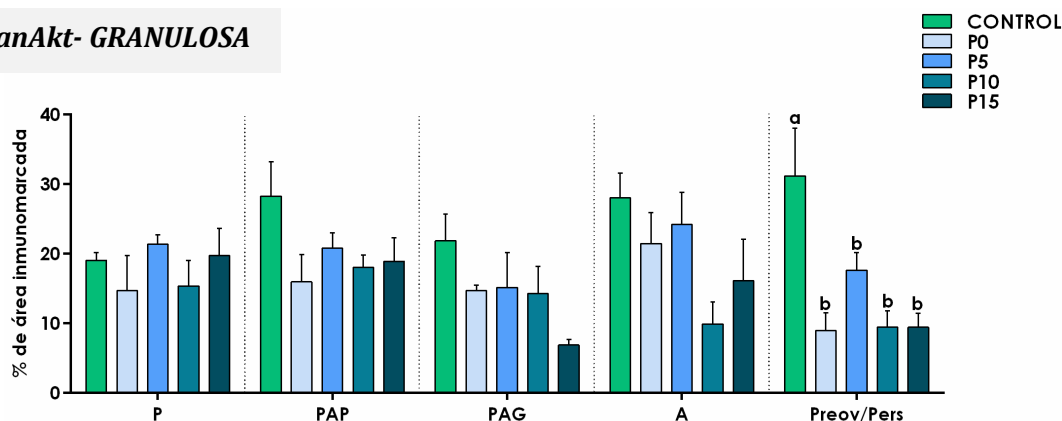
p-panAkt- GRANULOSA

Figura 129: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-panAkt en células de la granulosa de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la granulosa de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

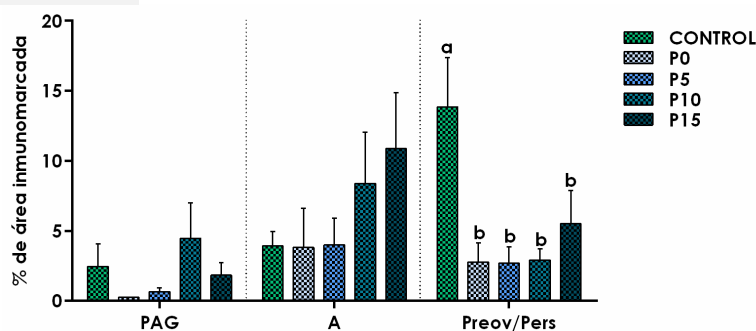
p-panAkt - TECA

Figura 130: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) del p-panAkt en células de la teca de los diferentes grupos. El análisis se realizó en células de la teca interna de folículos preantrales grandes (PAG), antrales (A), preovulatorios (Preov) y persistentes (Pers). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

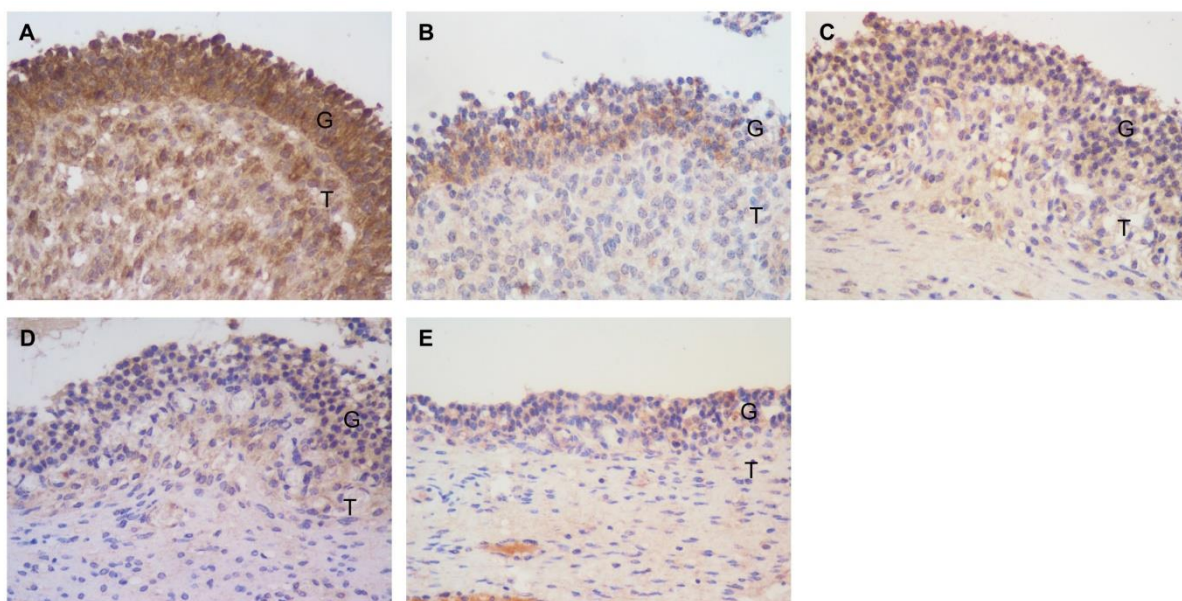


Figura 131: Imágenes representativas de la inmunomarcación de p-panAkt en los diferentes grupos. A) Folículo preovulatorio del grupo control. B) Folículo persistente del grupo P0. C) Folículo persistente del grupo P5. D) Folículo persistente del grupo P10. E) Folículo persistente del grupo P15. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Magnificación 400x.

4.3.3. Relación entre la expresión de proteínas fosforiladas y totales

Se analizó la relación entre la expresión proteica del p-IR y la expresión proteica del IR total, en las categorías de folículos preovulatorios (grupo control) y persistentes (grupos P0, P5, P10 y P15) en células de la granulosa y en células de la teca. En las células de la granulosa se detectó mayor fosforilación en los folículos preovulatorios respecto a los folículos persistentes del grupo P5 ($p < 0,05$). En las células de la teca, la fosforilación fue mayor en los folículos preovulatorios respecto a todos los folículos persistentes ($p < 0,05$) (Figura 132).

Se analizó la relación entre la expresión proteica del p-IRS1 y la expresión proteica del IRS1 total en las categorías nombradas previamente, en células de la granulosa y en células de la teca. En las células de la granulosa no se detectaron diferencias respecto a la fosforilación de IRS1 entre los diferentes grupos ($p > 0,05$). En las células de la teca, la fosforilación de IRS1 fue mayor en los folículos preovulatorios del grupo control y en los folículos persistentes del grupo P0 respecto a los folículos persistentes de los grupos P5, P10 y P15 ($p < 0,05$) (Figura 132).

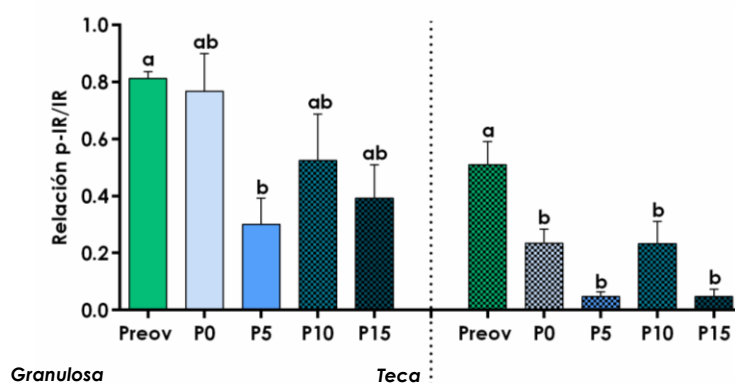
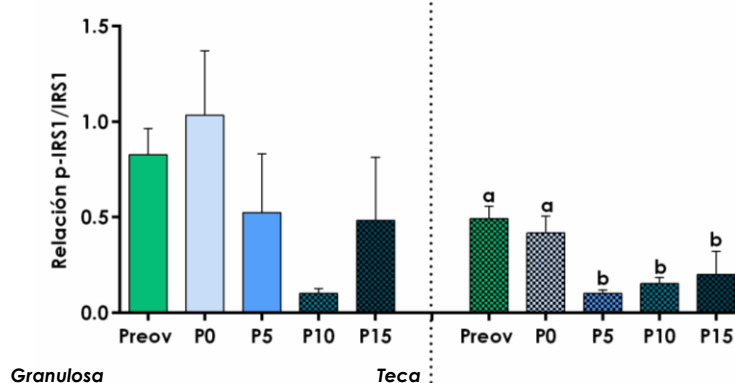
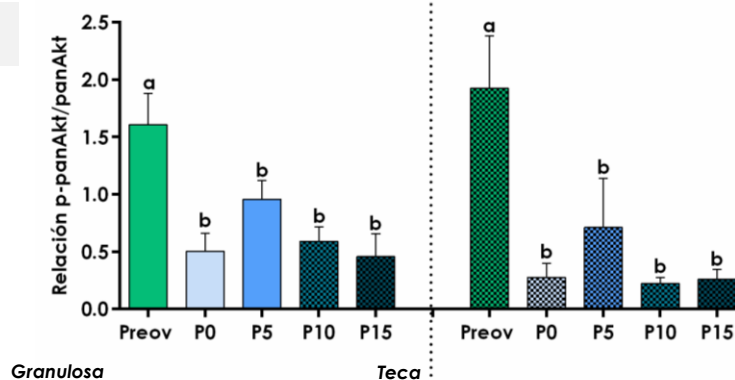
p-IR/IR*p-IRS1/IRS1**p-panAkt/panAkt*

Figura 132: Relación entre la expresión de proteínas fosforiladas y totales para IR, IRS1 y panAkt. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca de los diferentes grupos en folículos preovulatorios (Preov) y persistentes (P0, P5, P10 y P15). Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por último, analizamos la relación entre la expresión proteica del p-panAkt y la expresión proteica del panAkt total. Tanto en las células de la granulosa como en células de la teca detectamos una mayor fosforilación de panAkt en los folículos preovulatorios del grupo control respecto a todos los folículos persistentes (grupos P0, P5, P10 y P15) ($p < 0,05$) (Figura 132).

4.4. CAPÍTULO II:

Discusión

En el presente capítulo utilizamos un modelo experimental de persistencia folicular para evaluar el receptor de insulina y los componentes principales de la vía PI3K de señalización de insulina en las primeras etapas de desarrollo de la EQO. El modelo experimental utilizado, ha sido optimizado previamente por nuestro grupo de trabajo y demostró ser apropiado para estudiar las etapas iniciales del desarrollo de quistes en las vacas lecheras (Díaz y col., 2015, 2016; Stassi y col., 2017).

Se determinaron las concentraciones de insulina, tanto en suero, como en líquido folicular de vacas controles y de los diferentes grupos de persistencia folicular (P0, P5, P10 y P15). En suero, las concentraciones de insulina fueron mayores en todos los grupos de persistencia respecto al grupo control. En el líquido folicular, las concentraciones de insulina fueron mayores en los grupos de persistencia P5, P10 y P15 respecto al grupo control, no existiendo diferencias con el grupo P0. Estos resultados difieren con lo informado para quistes espontáneos, donde en trabajos previos se determinó una menor concentración sistémica de insulina respecto al grupo control (Hein y col., 2015; Gareis y col., 2018). Vanholder y col., (2005a) detectaron en vacas posparto menores concentraciones de insulina en aquellas que luego desarrollaron EQO, sugiriendo que la formación de quistes en vacas lecheras de alto rendimiento se asocia con niveles menores de insulina.

Las mayores concentraciones de insulina en el líquido folicular de los folículos persistentes podrían atribuirse a un efecto compensatorio a consecuencia de una mayor alteración en los primeros intermediarios de la cascada de señalización de la insulina a nivel ovárico. Por lo tanto, la alteración observada podría contribuir, o bien modulando intermediarios de otras vías de señalización capaces de interactuar con la vía en estudio, o promoviendo cambios que conducen a alteraciones en la funcionalidad ovárica en estadios posteriores. Posiblemente una modulación por retroalimentación conduciría posteriormente al cambio en el patrón de respuesta a la insulina en los quistes espontáneos. Estudios *in vivo* demostraron que el aumento de insulina en sangre genera un mayor diámetro en los folículos dominantes como así también, incrementos en la tasa de ovulación en vaquillonas (Harrison y Randel, 1986; Simpson y col., 1994; Gong, 2002). Sin embargo, se ha observado mediante estudios *in vivo* que las vacas con EQO tienen menor sensibilidad a esta hormona (Opsomer y col., 1999). Estos resultados podrían estar relacionados con una menor capacidad de respuesta dada por una menor

expresión y/o activación de los receptores e intermediarios de la vía de señalización de insulina, tal como determinamos en el presente estudio.

El IR se detectó en células de la granulosa y de la teca de diferentes especies mamíferas (Dupont y Scaramuzzi, 2016). De acuerdo con estudios previos, la expresión del IR se detectó en células de la granulosa y de la teca de folículos en todas las etapas de desarrollo, siendo mayor la expresión del IR en la población de células de la granulosa (Hein y col., 2015). Por su parte, Bossaert y col. (2010) observaron una intensa marcación en granulosa de folículos antrales y una muy débil marcación (casi nula) en células de la teca.

Los resultados presentados de este capítulo, muestran que la expresión proteica del IR en células de la granulosa fue mayor en los folículos preovulatorios del grupo control respecto a la detectada en todos los folículos persistentes. De acuerdo con estos resultados, en estudios previos de nuestro grupo se determinó una disminución de la expresión de IR en células de la granulosa de animales con EQO espontánea respecto a folículos antrales del grupo control (Hein y col., 2015).

La detección del p-IR denota el grado de expresión del receptor activado y los resultados presentados muestran la detección en ambas poblaciones celulares en todas las categorías estudiadas. La expresión proteica fue mayor tanto en células de la granulosa como en células de la teca en los folículos preovulatorios del grupo control respecto a todos los folículos persistentes (P0, P5, P10 y P15). Al realizar la relación p-IR/IR total, se observó que en las células de la granulosa la fosforilación fue mayor en los folículos preovulatorios respecto a los folículos persistentes del grupo P5. Por otro lado, en las células de la teca, la fosforilación fue mayor en los folículos preovulatorios del grupo control respecto a todos los folículos persistentes (grupos P0, P5, P10 y P15). Esto resulta importante dado que sugiere una disminución de la activación del receptor en las estructuras foliculares persistentes que disminuiría la interacción insulina-receptor y, en consecuencia, la cascada intracelular de insulina con las alteraciones celulares subsecuentes. La insulina ejerce sus efectos mediante la unión a su receptor, luego de esta unión el IR experimenta cambios conformacionales, que permiten la autofosforilación de los residuos de tirosina ubicados en las subunidades β intracelulares. Los residuos de tirosina fosforilados sirven como sitios de acoplamiento para diversos sustratos celulares, entre ellos, los IRS (Youngren, 2007; Dupont y Scaramuzzi, 2016).

La expresión proteica del IRS1 y su forma fosforilada (p-IRS1) fue detectada en el citoplasma de ambas poblaciones celulares, en todos los grupos evaluados. La expresión del IRS1 a nivel de células de la granulosa, fue menor en los folículos persistentes de los grupos P5 y P15 respecto al grupo control. Esto no se observó en quistes espontáneos (Hein y col., 2015), y se podría deber a una diferencia en los días de persistencia de esos quistes en el ovario. Además, en los estudios realizados en quistes espontáneos se consideraron como estructuras de referencia a los folículos antrales, sin distinguir al folículo dominante o preovulatorio en los cuales los mecanismos de señalización podrían estar expresados de forma diferencial. Por otro lado, se ha demostrado que la fosforilación/activación del IRS1 en el residuo de tirosina es necesaria para las respuestas a insulina, en cambio, la fosforilación de IRS1 en los residuos de serina tiene una doble función, ya sea para aumentar o disminuir los efectos de la misma (Gual y col., 2005). La fosforilación de serina/treonina del IRS1 afecta la capacidad del IRS1 para asociarse con el IR, inhibiendo la posterior fosforilación de tirosina estimulada por insulina y bloqueando la señal corriente abajo (Rui y col., 2001). Este es un mecanismo clave de retroalimentación negativa utilizado por la insulina en condiciones fisiológicas para terminar su acción, y el equilibrio entre la fosforilación de tirosina y la fosforilación de serina podría regular las funciones IRS1 (Gual y col., 2005). En este trabajo se utilizó un anticuerpo anti-p-IRS1, dirigido contra una región de IRS1 que contiene tirosina. Al evaluar la expresión del p-IRS1 se detectaron diferencias no sólo a nivel de las células de la granulosa, sino también de la teca, siendo mayor la expresión en folículos preovulatorios de animales controles, respecto a los folículos persistentes de los grupos P5, P10 y P15. Sin embargo, al evaluar la relación p-IRS1/IRS detectamos diferencias en la fosforilación sólo a nivel de células de la teca, siendo mayor la activación de IRS1 en folículos preovulatorios del grupo control y en los persistentes del grupo P0 respecto a los demás grupos de persistencia (P5, P10 y P15). A partir del día 5 de persistencia folicular se detectó una disminución en la activación de este nodo crítico de la cascada. En estudios previos realizados en quistes espontáneos, se detectaron niveles similares en la expresión de IRS1 (Hein y col., 2015), sin embargo, la diferencia con nuestros resultados podría encontrarse en la activación de la proteína.

En las células de la granulosa, PI3K regula la proliferación y diferenciación en respuesta a las gonadotrofinas sugiriendo un papel importante de este intermediario en el reclutamiento folicular (Dupont y col., 2012; Zheng y col., 2012). La expresión proteica

de PI3K se detectó en el citoplasma de ambas poblaciones celulares. Se determinó una disminución de la expresión en todos los folículos persistentes, tanto en células de la granulosa como en células de la teca, respecto a los folículos preovulatorios del grupo control, coincidiendo con estudios previos en los que se determinó una disminución de este intermediario en células de la teca de folículos quísticos espontáneos (Hein y col., 2015). Se ha reportado que mantener las actividades óptimas de señalización de la vía PI3K en el ovario parecería ser crítico para la funcionalidad ovárica normal y para la prevención de afecciones patológicas ováricas en los mamíferos (Zheng y col., 2012).

Por otro lado, el Akt ha sido localizado en ovarios de diversas especies como ratones, cerdas, ovejas y mujeres (Evans y Martin, 2000; Goto y col., 2007; Reddy y col., 2009). En este trabajo de tesis detectamos expresión proteica de panAkt y su forma fosforilada (p-panAkt) en células de la granulosa y de la teca foliculares. La marcación fue citoplasmática para ambas proteínas. A diferencia de lo observado en la enfermedad espontánea, donde encontramos una disminución de la expresión de panAkt total en folículos quísticos respecto a folículos controles, en células de la teca, no encontramos diferencias significativas en panAkt total entre los diferentes grupos en ninguna de las poblaciones en el modelo de persistencia. Sin embargo, al evaluar el p-panAkt encontramos una disminución de su expresión, en todos los folículos persistentes, para ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) respecto a los folículos preovulatorios del grupo control. Al evaluar la relación p-panAkt/panAkt total detectamos que la fosforilación de la proteína se encontró drásticamente disminuida ($p < 0,001$) en todos los folículos persistentes tanto en células de la granulosa como en células de la teca. Akt es fosforilada y activada mediante la PDK1, corriente debajo de PI3K (Taniguchi y col., 2006; Dupont y col., 2012). Como describimos previamente, Akt es uno de los nodos claves de la cascada de señalización de insulina, fosforila diversas quinasas y factores de transcripción implicados en los principales efectos metabólicos de esta hormona (Taniguchi y col., 2006). En el ovario, la insulina a través de Akt1 y FOXO1 puede modular la esteroidogénesis estimulada por LH y FSH. Del mismo modo, la FSH que actúa a través de mTOR y/o ERK puede regular la proliferación celular y la síntesis de proteínas. Además, la FSH actuando a través de Akt1 y FOXO3a es capaz de inhibir la apoptosis (Cecconi y col., 2012; Dupont y Scaramuzzi, 2016). En las células de la granulosa, la FSH regula la atresia folicular a través de la vía PI3K/Akt/FOXO3a. Efectos como la síntesis de proteínas y la proliferación celular tienen papeles determinantes en

la funcionalidad ovárica. Es interesante observar, que desde etapas previas al establecimiento del quiste en el ovario, ya se encuentra alterada la expresión de este intermediario.

Si bien se ha demostrado que numerosas moléculas están involucrados en la vía de señalización de la insulina, IR/IRS, PI3K y Akt son los nodos con mayor importancia. Cada uno de estos componentes es esencial para que la insulina ejerza su acción, se encuentran regulados por diversas vías y además median la interferencia con otras cascadas de señalización (Taniguchi y col., 2006). En los mamíferos, la vía de señalización de PI3K/Akt con todas sus ramificaciones podría ser el principal regulador no gonadotrópico de la diferenciación, el crecimiento y la supervivencia de los folículos. El bloqueo de esta vía produce infertilidad e inhibición de las acciones metabólicas de la insulina en el ovario, lo que evidencia su papel fundamental en la reproducción de las hembras (Cheatham y col., 1994; Brown y col., 2010; Dupont y Scaramuzzi, 2016).

En los mamíferos, el crecimiento folicular, la ovulación y la luteinización están fuertemente regulados por la FSH y la LH. La FSH y la LH median estos efectos al inducir un patrón complejo de expresión génica en las células de la granulosa que está regulado por diferentes cascadas de señalización, como las cascadas de cAMP/PKA, ERK1/2 y PI3K (Fan y col., 2008).

En el modelo de persistencia folicular utilizado, Díaz y col. (2015) detectaron menores concentraciones de progesterona en el líquido folicular de los folículos persistentes respecto a los folículos preovulatorios del grupo control. Estos resultados son coincidentes con los niveles determinados en la EQO espontánea, detallados en el capítulo anterior y en trabajos anteriores del grupo (Amweg y col., 2013) que apoyan la utilización del modelo experimental.

Las concentraciones de 17β -estradiol evaluadas en el modelo, fueron menores en el grupo 15 de persistencia. Sin embargo, en vacas con EQO espontánea no se encontraron diferencias en las concentraciones de esta hormona (Amweg y col., 2013; Gareis y col., 2018a).

Como se menciona previamente, la insulina es capaz de interactuar con la FSH para estimular la producción de progesterona e inhibir la producción de estrógenos (Dupont y Scaramuzzi, 2016). En este trabajo se muestra que, si bien las concentraciones sistémicas e intrafoliculares de insulina son elevadas, la mayoría de los componentes estudiados de la vía de señalización se encuentran disminuidos en los

folículos persistentes, lo que podría reflejarse por los bajos niveles de progesterona en líquido folicular encontrados por Díaz y col. (Díaz y col., 2015). Richards y Pangas (2010) determinaron que la activación de la vía MAPK-ERK-1/2 también es necesaria para la secreción de progesterona mediada por LH.

Los resultados presentados en este capítulo reflejan una notable alteración de los intermediarios de la vía de señalización de insulina en los estadios previos al desarrollo del quiste (folículos persistentes).

En este sentido, una perturbación en la respuesta a la insulina durante las primeras etapas de persistencia folicular tendría efectos contraproducentes en el metabolismo celular de los folículos, la esteroidogénesis y el proceso de ovulación, conduciendo al desarrollo de la EQO.

5. CAPÍTULO III:

***Alteraciones en sensores
metabólicos clave
involucrados en la EQO***

5.1. CAPÍTULO III:

Introducción

En los rodeos lecheros, se observó que los problemas de subfertilidad se fueron acentuando a lo largo de los años, coincidiendo con la intensificación de los tambos, y la selección genética dirigida hacia una mayor producción de leche individual (Butler, 2003; Pryce y col., 2004; Leroy y col., 2008) (Figura 133).

Las adaptaciones endocrinas y metabólicas, propias de la etapa de lactancia, asociadas con la disminución de la ingesta de alimento en la última etapa de la gestación y un notable aumento de los requerimientos en el posparto, contribuyen a la exacerbación del balance negativo de nutrientes en la lactancia temprana. Al mismo tiempo, este período se caracteriza por un alto riesgo de enfermedades que a menudo comprometen la fertilidad (Butler, 2003; Santos y col., 2010). Los desbalances nutricionales durante el período periparto producen una disminución en los niveles de glucosa, insulina, IGF1, en la frecuencia de los pulsos de LH, e incrementos de algunos metabolitos como BHB, AGNE y triglicéridos, principalmente en el posparto y lactancia temprana, que cuando alcanzan niveles excesivamente elevados resultan perjudiciales para la salud reproductiva de los animales (Roche, 2006). Más aún, la subfertilidad en las vacas lecheras no puede atribuirse a una sola causa, sino que se considera de origen multifactorial (Leroy y col., 2008). Tal es así que la nutrición influye considerablemente en el desarrollo folicular ovárico en rumiantes, posiblemente a través de cambios en las hormonas metabólicas y también por los efectos directos de nutrientes particulares en el ovario. Entre las hormonas con funciones metabólicas importantes que repercuten en la fertilidad del ganado se pueden mencionar a: insulina, IGFs, GH (Hormona del crecimiento, del inglés Growth Hormone), hormonas tiroideas, grelina, apelina, y determinadas adipocitoquinas producidas por el tejido adiposo que incluyen leptina, adiponectina y resistina (Dupont y col., 2014a).

Como se describe en los capítulos anteriores, la EQO es una de las disfunciones más importantes asociada a las vacas lecheras de alto rendimiento. Posee una etiopatogenia compleja y multifactorial, cuyo desarrollo puede estar influenciado por aspectos nutricionales, metabólicos y endocrinos. Además de los desequilibrios hormonales, como la insulina, la adiponectina y la leptina, se ha propuesto que diversos metabolitos, como la glucosa, los AGNE y los aminoácidos, participarían en la formación de quistes (Vanholder y col., 2006; Braw-Tal y col., 2009; Dupont y col., 2014a; Dupont y col., 2014b). Por lo tanto, un desbalance entre el aporte de energía y su utilización, comprometería la salud del animal con consecuencias a mediano y largo plazo.

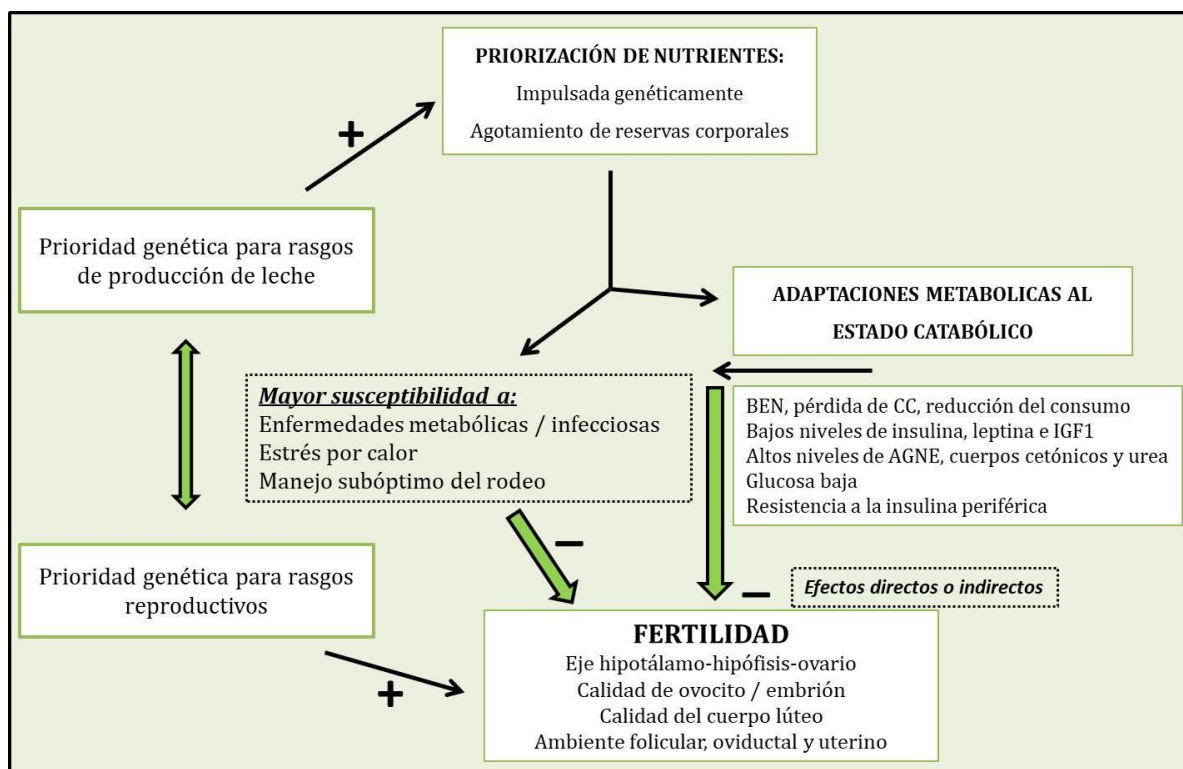


Figura 133: Interacción entre la selección genética para la producción de leche y la fertilidad. Los cambios metabólicos y endocrinos impuestos que sostienen la producción de leche en combinación con el aumento de la susceptibilidad al estrés por calor, las enfermedades y las condiciones de manejo subóptimas afectan negativamente el rendimiento reproductivo de la vaca lechera de alta producción. Adaptado de Leroy y col., 2008.

5.1.1. Influencia del balance energético negativo sobre la ovulación y la EQO

Luego del parto, los requerimientos nutricionales (principalmente energéticos) aumentan de manera abrupta en las vacas lecheras a causa de la gran producción láctea. Simultáneamente, existe un bajo consumo de materia seca, lo que conduce a un balance energético negativo (Leroy y col., 2008a). El BEN puede ser más o menos pronunciado y de duración variable, según el potencial genético del animal y su alimentación (Morales Piñeyrúa y col., 2018). Las vacas posparto priorizan y desvían la mayor parte de su energía hacia la producción de leche y luego hacia la recuperación de la condición corporal. Sólo después de que se satisfacen estas necesidades inmediatas se reanudan los procesos reproductivos (Lucy, 2003).

La glucemia disminuye hasta aproximadamente 2 semanas posteriores al parto y como consecuencia disminuye el estímulo en las células pancreáticas para la liberación

de insulina, hormona necesaria para promover la captación de glucosa por diversos tejidos. Además, la concentración de esta hormona se correlaciona positivamente con la ingesta de energía, y como se menciona anteriormente, se encuentra disminuida alrededor del parto. La disminución drástica de la insulinemia direcciona indirectamente a la glucosa hacia la glándula mamaria para la síntesis de lactosa, promoviendo la gluconeogénesis hepática y la lipólisis del tejido adiposo (Lucy, 2007; Leroy y col., 2008). Esta lipomovilización provoca el incremento en los AGNE en la circulación como recurso alternativo de energía para diversos tejidos, preservando a la glucosa para su re-direccionamiento hacia la glándula mamaria (Vernon, 2005). Por lo tanto, el cambio en el estado metabólico irrumpe en el periparto, afectando en consecuencia a la función ovárica (Kawashima y col., 2012). Se ha propuesto que el BEN favorece la incidencia de anestro y anovulación postparto, además de reducir la fertilidad y el desarrollo de EQO (Diskin y col., 2003; Bossaert y col., 2008).

Los cambios en las concentraciones de metabolitos como la glucosa y AGNE en sangre pueden conducir a alteraciones en el microambiente del folículo dominante (Leroy y col., 2004b). Por lo tanto, en el postparto el desarrollo del BEN puede afectar la calidad tanto del ovocito como de las células de la granulosa. Un estudio reciente ha demostrado que las concentraciones plasmáticas altas de AGNE durante el periparto se asocian con una ovulación retardada en las vacas lecheras posparto (Kawashima y col., 2012).

5.1.2. Descripción de algunos metabolitos en líquido folicular

El líquido folicular proporciona un ambiente bioquímico propicio para el desarrollo del ovocito previo a su ovulación (Edwards, 1974; Chang y col., 1976; Gosden y col., 1988; Józwiak y col., 2001). Este compartimiento avascular se encuentra separado del estroma ovárico por la pared folicular, que constituye una "barrera hemato-folicular" (Okuda y col., 1982; Bagavandoss y col., 1983). El líquido folicular es una combinación compleja que consiste en agua y solutos derivados del plasma a través de capilares sanguíneos tecales, y sustancias producidas localmente, como consecuencia del metabolismo y de la función endocrina de las células foliculares (Gérard y col., 2002; Leroy y col., 2004a; Nandi y col., 2007). El trasudado plasmático necesita cruzar el intersticio tecal, la lámina basal folicular y la capa de células de la granulosa mural para

así llegar a la cavidad del folículo (Rodgers y Irving-Rodgers, 2010). El líquido se acumula en el antro a medida que éste va creciendo, bañando el ovocito y proporcionando el medio para su desarrollo y maduración (Leroy y col., 2012) (Figura 134).

La composición bioquímica del líquido folicular no es constante y puede variar frente a determinadas circunstancias. Diversos autores han demostrado que las concentraciones intrafoliculares de metabolitos (como glucosa, colesterol y triglicéridos) cambian a medida que las células foliculares crecen y maduran y con el incremento del tamaño folicular (Nixon y col., 1988; Leroy y col., 2004b; Tabatabaei y col., 2011). Otros factores que influyen en la composición del líquido folicular son el estrés calórico (Shehab-El-Deen y col., 2010), el período periparto y las condiciones de desbalance metabólico sistémico (Leroy 2004b). Las modificaciones en la composición del líquido folicular pueden influir en la síntesis de esteroides, la maduración y calidad de los ovocitos, así como también en la ovulación (Moradi Kor y Moradi, 2013).

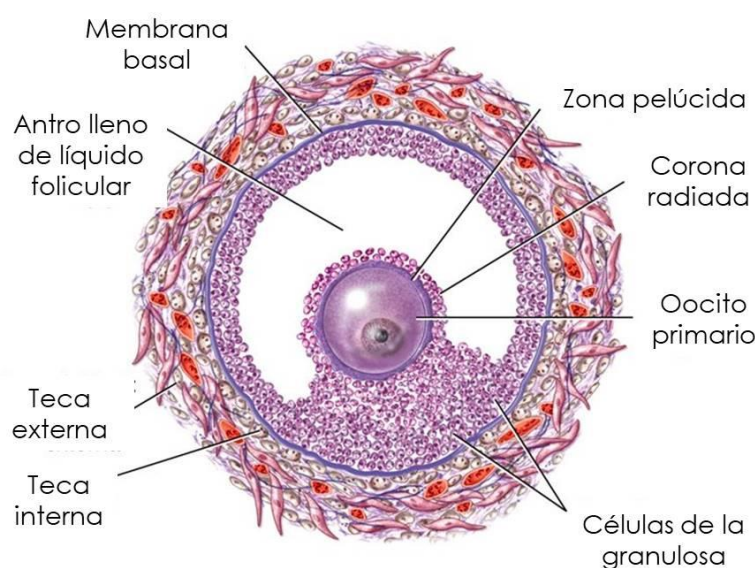


Figura 134: Esquema de un folículo antral, destacando sus componentes principales. Adaptado de Hossler FE, 2014.

5.1.2.1. Glucosa

La glucosa, no sólo es el combustible por excelencia de la mayoría de las células del organismo, sino que además en el ovario representa la mayor fuente energética en el

bovino, ratón, humano, entre otros (Leese y Lenton, 1990; Boland y col., 1994; Rabiee y col., 1997, 1999). La glucosa es indispensable para la correcta maduración del ovocito y expansión del cumulus (Leroy y col., 2004, 2006; Bilodeau-Goeseels, 2006; Sutton-McDowall y col., 2010). Es posible que la glucosa sea utilizada por la vía anaeróbica, generando lactato, para la producción de energía (Leese y Lenton, 1990; Boland y col., 1994; Rabiee y col., 1999, 1997). Leese y Lenton (1990) concluyeron que, en el líquido folicular de mujeres, las concentraciones de glucosa y lactato son el resultado del influjo desde el plasma hacia el líquido folicular y de la glucólisis en las células de la granulosa. En vacas y cerdas, se ha descrito que el diámetro de los folículos aumenta proporcionalmente con la concentración intrafolicular de glucosa (Chang y col., 1976; Landau y col., 2000; Leroy y col., 2004a).

5.1.2.2. Triglicéridos

Los triglicéridos son una de las formas de almacenamiento de los ácidos grasos y están constituidos por tres moléculas de ácido graso esterificadas a un esqueleto de glicerol. Los triglicéridos son transportados en sangre mediante lipoproteínas que se clasifican según su densidad en: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés “very low density lipoproteins”), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, “intermediate density lipoproteins”), lipoproteínas de baja densidad (LDL, “low density lipoproteins”) y lipoproteínas de alta densidad (HDL, “high density lipoproteins”) (Figura 135). Los quilomicrones son los encargados de transportar lípidos desde el intestino hacia los tejidos (lípidos exógenos), mientras que las restantes lipoproteínas se encargan del transporte de lípidos endógenos, que son aquellos sintetizados en el organismo (Blanco, 2006).

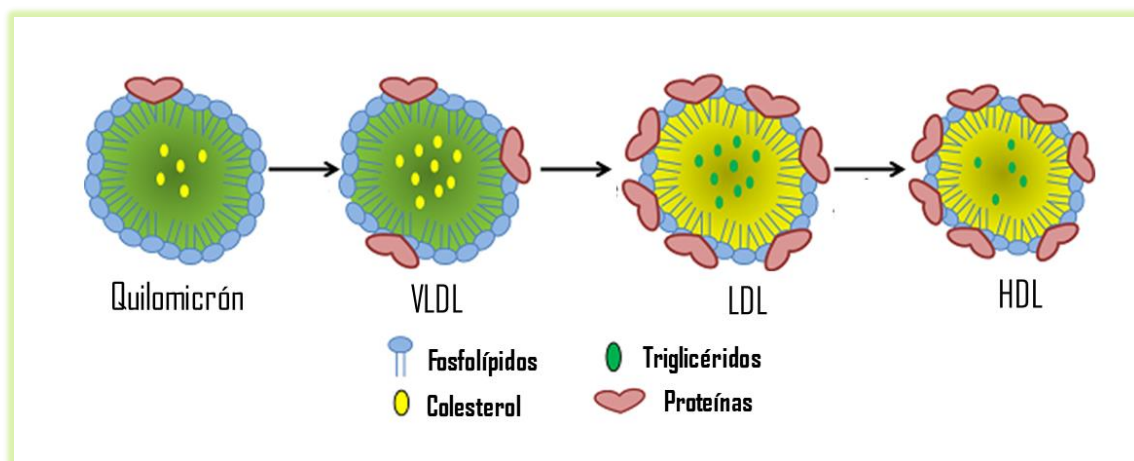


Figura 135: Esquema de las diferentes lipoproteínas encontradas en sangre. Fuente: <https://study.com/academy/lesson/what-are-lipoproteins-definition-functions-types.html>

Diversos autores han reportado la presencia de ácidos grasos y de triglicéridos en el líquido folicular de numerosas especies que constituirían la fuente de energía alternativa para las células ováricas (McEvoy y col., 2000; Leroy y col., 2004a; Nandi y col., 2007; Robker y col., 2009; Renaville y col., 2010; Abd Ellah y col., 2010). Se ha determinado que las células ováricas cultivadas *in vitro* pueden absorber y consumir triglicéridos del medio (Ellah y col., 2010), y se ha demostrado una acumulación de lípidos en ovocitos y embriones cultivados *in vitro* (Kim y col., 2001). Si bien los triglicéridos están presentes en el líquido folicular, probablemente no pueden atravesar la membrana folicular ya que las VLDL son excesivamente grandes para pasar esta barrera (Grummer y Carroll, 1988; Kim y col., 2001; Albomohsen y col., 2011). Por lo tanto, se ha descrito que en los mamíferos la HDL es la única lipoproteína capaz de transportar a los triglicéridos presente en el líquido folicular debido a la permeabilidad de la membrana basal del folículo que permite el pasaje de proteínas séricas de hasta 300 kDa (Shalgi y col., 1973), excluyendo LDL y VLDL.

Dentro de las células, los triglicéridos se almacenan en balsas lipídicas (Dunning y col., 2014). La utilización de ácidos grasos como combustible metabólico requiere la hidrólisis del triglicérido, catalizado por lipasas. Las células del cumulus y los ovocitos podrían captar los ácidos grasos del medio extracelular, o bien generarlos a partir de las reservas lipídicas (Dunning y col., 2014).

Se ha registrado que las concentraciones de triglicéridos son menores en líquido folicular que en suero (Leroy y col., 2004b). Wehrman y col. (1991) observaron que la

concentración de triglicéridos en el folículo ovárico bovino, se mantiene relativamente constante e independientemente a la trigliceridemia, a causa del estado fisiológico o a la dieta. Estos datos apoyan la propuesta de que los niveles foliculares de triglicéridos son principalmente el resultado de procesos metabólicos locales (Leroy y col., 2004a). Nandi y col. (2007) observaron en ovejas, que las concentraciones de triglicéridos fueron mayores en folículos pequeños que en grandes, coincidiendo con Ellah y col. (2010) quienes en búfalas determinaron una correlación negativa entre tamaño folicular y la concentración de triglicéridos.

5.1.2.3. *Colesterol*

El colesterol es un lípido esteroide precursor en la síntesis de compuestos con importante actividad biológica como son las hormonas adrenocorticales y sexuales, ácidos biliares, etc. El colesterol que llega a la sangre circula unido a diferentes lipoproteínas, aunque la mayor parte se encuentra asociada a las LDL. El colesterol presente en el líquido folicular estaría unido a las HDL ya que, como se mencionó anteriormente, sería la única lipoproteína que pasaría la membrana hemato-folicular. El colesterol del líquido folicular provendría de dos fuentes: a) síntesis celular *de novo* a partir de acetato, y b) de las lipoproteínas plasmáticas (Moradi Kor y Moradi, 2013). Diversos autores han determinado que el nivel de colesterol total en suero es mayor que en el líquido folicular, al igual que los triglicéridos (Leroy y col. 2004; Ellah y col., 2010).

5.1.2.4. *Ácidos grasos no esterificados*

Los AGNE, o también llamados ácidos grasos libres, son ácidos monocarboxílicos de cadena lineal, generalmente con un número par de átomos de carbono, y pueden o no tener dobles enlaces, denominándose saturados (sin dobles enlaces) o insaturados (con uno o más dobles enlaces). La β -oxidación de los ácidos grasos resulta de gran utilidad para el organismo para la obtención, de energía (en forma de ATP) y acetil-CoA, entre otros. Los AGNE se transportan en la sangre vehiculizados por la albúmina, y este complejo puede penetrar fácilmente en la pared folicular. Inmediatamente al ingresar a

la célula, los ácidos grasos libres o AGNE son inmediatamente esterificados junto a la coenzima A (CoA), ya que de otra manera resultarían tóxicos para los tejidos.

Diversos estudios han demostrado la relación entre el estado metabólico de la hembra respecto a su microambiente folicular y la asociación entre las concentraciones sistémicas e intrafoliculares de AGNE en vacas (Jorritsma y col., 2003) y en mujeres (Valckx y col., 2012). Sin embargo, existen estudios en los que difieren las concentraciones entre ambos compartimentos, así como también los perfiles de ácidos grasos (Leroy y col., 2005; Valckx y col., 2014; Van Hoeck y col., 2014; Aardema y col., 2018). Algunos autores (Renaville y col., 2010; Jungheim y col., 2011) sugieren que los folículos tienen su propio metabolismo lipídico, que las células del folículo ovárico metabolizan ácidos grasos específicos a diferentes velocidades o bien, que existe un transporte diferencial de ácidos grasos hacia el folículo ovárico.

Estudios *in vitro*, han demostrado que las concentraciones altas de AGNE resultan citotóxicas para las células de la granulosa y de la teca, comprometiendo su viabilidad (Mu, 2001; Leroy y col., 2005; Van Hoeck y col., 2013). Es por ello que los altos niveles de AGNE característicos de los períodos de BEN son capaces de afectar negativamente al crecimiento y desarrollo folicular, favoreciendo el desarrollo de EQO (Vanholder y col., 2006), así como la maduración de los ovocitos (Leroy y col., 2004a). Estudios en mujeres, han demostrado que los niveles elevados de AGNE en el líquido folicular conducen a la formación de ovocitos de baja calidad durante la fertilización *in vitro* (Jungheim y col., 2011). Las concentraciones elevadas de AGNE se han asociado con una menor capacidad de desarrollo de ovocitos (Jorritsma y col., 2003).

Los AGNE y BHB son los principales metabolitos que reflejan el estado energético del ganado lechero. Los AGNE indican el grado de movilización de grasa y pueden ser el biomarcador más sensible al BEN durante el período seco tardío y el primer mes de lactancia. Una posible consecuencia del BEN es la cetosis clínica o subclínica, que refleja la beta-oxidación de los AGNE a los cuerpos cetónicos, incluido el BHB (Jackson y col., 2011).

5.1.2.5. Beta-hidroxibutirato

Los cuerpos cetónicos se sintetizan principalmente en las mitocondrias de las células hepáticas en respuesta a bajos niveles de glucosa y al agotamiento de las reservas de glucógeno. La cetogénesis se origina para que el organismo disponga de la energía que fue almacenada como ácidos grasos. A través de la beta-oxidación, los ácidos grasos son empleados para sintetizar acetil-CoA. En condiciones normales la oxidación del acetil-CoA sucede en el ciclo de Krebs. Sin embargo, si la cantidad de acetil-CoA supera a la capacidad de procesamiento del ciclo de Krebs, o si la cantidad de los otros precursores como el oxaloacetato es baja, el acetil-CoA se re-direcciona a la síntesis de cuerpos cetónicos vía acetil-CoA y β -hidroxi-metilglutarilCoA (HMG-CoA). Los cuerpos cetónicos, y en particular el BHB, se utilizan como indicador del grado de oxidación de las grasas en el hígado (Leblanc, 2010). Cuando la vaca está en BEN aumentan los cuerpos cetónicos, y si se acumulan en mayor cantidad de la que pueden ser metabolizados, predisponen a la generación de enfermedades clínicas o subclínicas, como la cetosis y el desplazamiento abomasal entre otras (Leblanc, 2010).

Vanholder y col. (2006), observaron que la suplementación con BHB a células de la granulosa de bovinos en cultivos condujo a un mayor número de células, sugiriendo que las mismas utilizarían los cuerpos cetónicos como fuente alternativa de energía cuando los niveles de glucosa son bajos (Veech, 2004; Vanholder y col., 2006;). Rabiee y col. (Rabiee y col., 1997, 1999) mediante estudios *in vivo* en bovinos detectaron que el ovario utiliza BHB como fuente de energía, principalmente durante la lactancia temprana cuando las vacas se encuentran en BEN y las concentraciones de glucosa en plasma son bajas.

Por otro lado, se ha demostrado que la concentración de este metabolito aumenta de folículos pequeños a grandes, posiblemente por una secreción local por las células foliculares (Leroy y col., 2004a).

5.1.4. Beta-oxidación en el ovario

La oxidación de ácidos grasos es un proceso de múltiples etapas que tiene lugar tanto en las mitocondrias como en los peroxisomas. En el hígado de rumiantes la β -oxidación peroxisomal de ácidos grasos es tan importante como la mitocondrial (ocurre

50% en peroxisomas, 50% en mitocondrias), a diferencia de otras especies en las que la mitocondrial tiene un mayor protagonismo (sólo un 26 % ocurre en peroxisomas) (Grum y col., 1994).

Mientras que la enzima carnitin palmitoiltransferasa 1 (CPT1) es una de las enzimas principales de la beta-oxidación a nivel mitocondrial, la acetil-CoA oxidasa 1 (ACOX1) es una de las enzimas claves de la beta-oxidación pero a nivel peroxisomal. Como se menciona previamente, en el ovario hay abundantes niveles de triglicéridos y ácidos grasos, tanto en el líquido folicular como en las reservas intracelulares, que serían utilizados como fuente de energía. Sin embargo, la beta-oxidación de ácidos grasos en este órgano se encuentra escasamente descripta (Dunning y col., 2010; Renaville y col., 2010; Dunning y col., 2014). Existen algunos antecedentes de los efectos de la beta-oxidación en ovocitos y embriones. En la vaca, la inhibición de la beta-oxidación durante la maduración de los ovocitos produce una disminución del desarrollo del blastocisto (Ferguson y Leese, 2006). Estudios *in vitro* han demostrado que la beta-oxidación es necesaria para la reanudación meiótica en el ratón (Downs y col., 2009). En ovocitos de vaca y cerda, la inhibición del metabolismo de triglicéridos con palmoxirato de metilo (inhibidor de la CPT1) durante la maduración *in vitro*, conduce a una disminución de la viabilidad, que se refleja en una menor capacidad para generar un blastocisto después de la fertilización (Sturmey y Leese, 2003; Ferguson y Leese, 2006). En ratones hembra, la ablación del gen de *ACOX1*, condujo a la esterilidad asociada con ovarios más pequeños (Fan y col., 1996). En vacas, los ovocitos y los embriones son capaces de completar la maduración y las divisiones celulares sin la provisión de un suministro de energía exógeno, lo que implica una dependencia de las reservas endógenas de energía lipídica (Sturmey y col., 2009). En cambio, los ovocitos humanos y de ratón contienen cantidades mínimas de lípidos y necesitan de un suministro de energía externo para completar la maduración (Dunning y col., 2010; Sanchez-Lazo y col., 2014).

5.1.5. Adiponectina

El tejido adiposo, además de ser un tejido de reserva energética, actúa como un órgano endocrino que secreta una cantidad de adipoquinas biológicamente activas involucradas en múltiples procesos fisiológicos tales como inflamación y metabolismo

de lípidos y glucosa, con efectos directos e indirectos sobre la reproducción (Kadowaki y Yamauchi, 2005; Campos y col., 2008; Sauerwein y Häußler, 2016). En esta tesis se describe una de las adipoquinas: la adiponectina.

La adiponectina (conocida como AdipoQ, Acrp30, apM1 y GBP28) es una proteína de 244 aminoácidos (30 kDa) derivada principalmente de los adipocitos maduros del tejido adiposo blanco (Budak y col., 2006; Maillard y col., 2010). En mamíferos, es una de las adipoquinas más abundantes en la circulación sanguínea y su concentración se encuentra en el orden de los $\mu\text{g/ml}$ (Heinz y col., 2015). La adiponectina se sintetiza como un único monómero de 28 kDa que puede multimerizarse para formar diferentes estructuras de variados tamaños antes de la secreción (Waki y col., 2003) (Figura 136), y en circulación puede encontrarse como:

- trímero con bajo peso molecular (peso molecular bajo, 67 kDa).
- hexámero con peso molecular medio (peso molecular medio, 136 kDa).
- forma multimérica de 12 a 18 monómeros con alto peso molecular (Peso molecular alto > 300 kDa).

Esta última estructura es considerada la forma biológicamente activa predominante (Kadowaki y Yamauchi, 2005; Heinz y col., 2015).

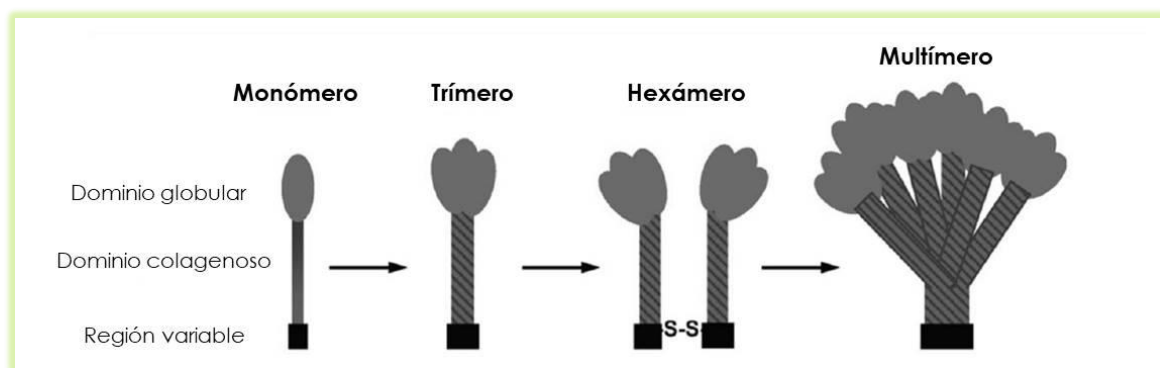


Figura 136: Esquema de multimerización de adiponectina. Adaptado de Simpson y Whithead, 2010; Franziska, 2014.

5.1.5.1. Receptores y vías de acción

La adiponectina ejerce sus acciones mediante la unión a dos receptores: AdipoR1 y AdipoR2. Ambos receptores son proteínas integrales de membrana, contienen siete

dominios transmembrana (Ouchi y col., 2001) y, a diferencia de la mayoría de los receptores acoplados a proteína G, los extremos N-terminal de AdipoR1 y AdipoR2 se encuentran en el dominio intracelular y los extremos C-terminal en el dominio extracelular, siendo estructural y funcionalmente diferentes (Yamauchi y col., 2003; Buechler y col., 2010). También se ha encontrado que las formas hexaméricas y de alto peso molecular de la adiponectina se unen a proteínas T-cadherinas en células endoteliales y de músculo liso. Sin embargo, las T-cadherinas son proteínas extracelulares ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), y por lo tanto, deberían asociarse a alguna proteína de membrana aún no identificada para la transducción de señales (Hug y col., 2004).

Una vez unida la adiponectina a sus receptores, AdipoR1 y AdipoR2 se vuelven biológicamente activos al unirse a la proteína adaptadora APPL1 (Mao y col., 2006) para activar diferentes vías de señalización intracelular implicadas en la regulación del metabolismo energético. Entre las vías se incluye la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), el receptor nuclear activador de la proliferación peroxisomal (PPAR), la proteína kinasa B (Akt), p38 y p44/42 (ERK1/2) (Yamauchi y col., 2003; Mao y col., 2006; Lee y col., 2008; Maillard y col., 2010; Thundyil y col., 2012). Al parecer el AdipoR1 media los efectos de la adiponectina a través de AMPK, mientras que el AdipoR2 lo hace vía PPARs (Kadowaki y col., 2008). Otra proteína adaptadora es la APPL2, cuya función es bloquear la señalización de adiponectina a través de AdipoR1 y AdipoR2, mediante la inhibición competitiva de APPL1 (Ruan y Dong, 2016) (Figura 137).

Los receptores AdipoR1 poseen gran afinidad por la adiponectina globular y baja afinidad por la adiponectina de longitud completa. Por el contrario, los AdipoR2 poseen afinidad intermedia para ambas formas de adiponectina. Su unión a los receptores AdipoR1 incrementa la captación de glucosa en músculo y disminuye la gluconeogénesis en hígado, y al unirse a los AdipoR2, aumenta la oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo. Respecto a los mecanismos moleculares de su acción, se ha demostrado que la adiponectina estimula la utilización de glucosa y la oxidación de ácidos grasos a través de la activación de la enzima 5-AMP kinasa (AMPK) en respuesta al estrés metabólico y la demanda energética. Además, el mecanismo por el cual la adiponectina participa en el control energético (involucrando el catabolismo de lípidos o de carbohidratos) podría

involucrar la regulación de la actividad de otras proteínas asociadas con estos procesos, entre ellos al PPAR γ (Kadowaki y Yamauchi, 2005; Dupont y col., 2014a).

La AMPK es un sensor metabólico del estado de energía celular y desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas de los tejidos periféricos y centrales (Kadowaki y Yamauchi, 2005; Dupont y col., 2014a). Además, en el ovario, la AMPK modula la proliferación celular y la supervivencia, así como algunas funciones reproductivas como la esteroidogénesis ovárica y la maduración de los ovocitos (Dupont y col., 2008a). Por lo tanto, la adiponectina y la AMPK serían importantes sensores de combustible necesarios para el crecimiento de folículos, ovocitos y embriones.

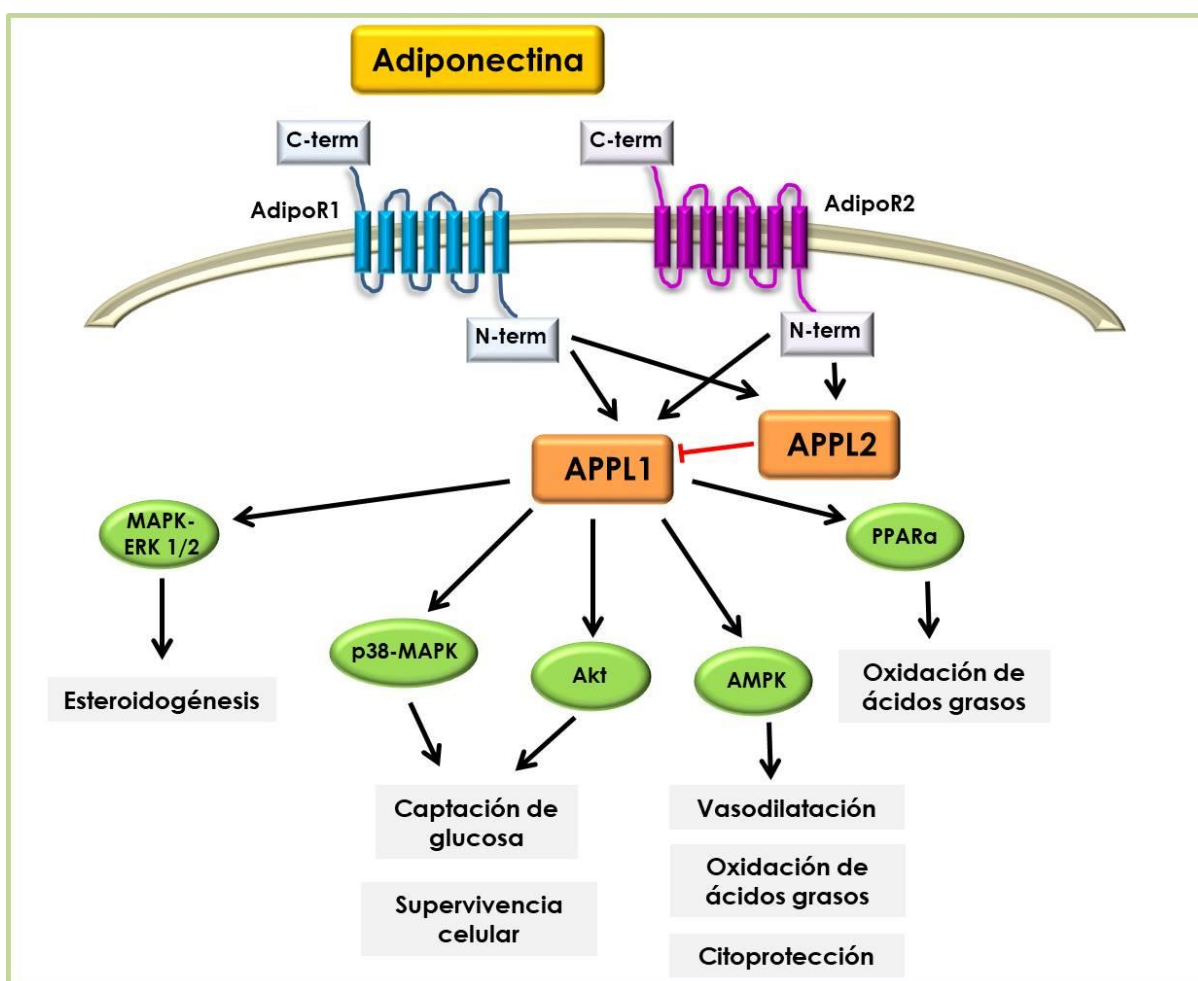


Figura 137: Vías de señalización de adiponectina mediante la activación de sus receptores y respuesta esperada en base a la vía activada. Adaptado de Reverchon y col, 2014.

5.1.5.2. Efectos de la adiponectina

La adiponectina desempeña un papel determinante en el control del metabolismo de los lípidos, la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina (Dupont y col., 2008a; Buechler y col., 2010; Maillard y col., 2010). Se ha demostrado que la adiponectina aumenta la lipoxidación en el músculo esquelético y los miocitos (Fruebis y col., 2001; Yamauchi y col., 2001) y reduce la producción de glucosa en hígado (Berg y col., 2001; Combs y col., 2001).

5.1.5.3. Relación de la adiponectina con trastornos reproductivos

Considerando la estrecha asociación entre la resistencia a la insulina y el incremento de las enfermedades reproductivas con la adiposidad en mujeres (Dunaif, 1997), es importante considerar a los factores derivados de los adipocitos (adipoquinas) como posibles integrantes de alteraciones en la reproducción.

La expresión de la adiponectina y sus receptores varía en las diferentes células del ovario bovino durante su desarrollo morfológico y fisiológico (Tabandeh y col., 2010). La adiponectina y sus receptores se expresan en células tecales intersticiales, ovocito y células de la granulosa de ratas, mujeres y vacas (Chabrolle y col., 2007; Michalakis y Segars, 2010; Tabandeh y col., 2010). Además, Oliveira y col. (2017) detectaron adiponectina y sus dos receptores en folículos ováricos de cabras.

Existen evidencias controversiales sobre los efectos de la adiponectina sobre la esteroidogénesis. Ledoux y col. (2006) describieron que la adiponectina, mediante la unión a sus dos receptores, aumenta la producción de estrógenos y progesterona inducida por IGF1 en células de la granulosa de folículos porcinos. Sin embargo, en bovinos otros autores observaron que poseía efectos inhibitorios sobre la esteroidogénesis en células de la teca regulada por LH, IGF1 e insulina (Lagaly y col., 2008; Dupont y col., 2012) e incluso sobre células de la granulosa (Maillard y col., 2010). Comim y col. (2016) observaron que la adiponectina reduce los niveles de andrógenos ováricos en un modelo desarrollado en ratones, y que además reduciría el estrés

oxidativo en el tejido ovárico. Además, Comim y col. (2013) propusieron que las alteraciones en la adiponectina y sus receptores son parte de un mecanismo que vincula la disfunción metabólica y reproductiva en mujeres con síndrome de ovario poliquístico.

Considerando los antecedentes descritos, y la importancia del metabolismo en la funcionalidad ovárica, nos propusimos identificar y caracterizar casos de EQO teniendo en cuenta variables como el balance energético, nutrición, condición corporal y producción láctea; y además, determinar los perfiles de AGNE, BHB, triglicéridos, colesterol y glucosa como parámetros metabólicos a nivel plasmático e intrafolicular, evaluando posibles vías implicadas en la metabolización lipídica.

5.2. CAPÍTULO III:

Materiales y métodos

5.2.1. Procedimientos generales efectuados con animales

Todos los procedimientos realizados con animales fueron previamente aprobados por el Comité de Ética y Seguridad Institucional de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral de Santa Fe (Protocolo N° 131/12), y se realizaron de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (*Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*. 3° Ed. Federation of Animal Science Societies, 2010).

5.2.1.1. Animales y grupos de estudio

En el presente capítulo haremos referencia a 2 grupos de animales: grupo control y grupo EQO. Para ambos grupos se seleccionaron vacas multíparas (2 a 4 partos) de la raza Holando Argentino en lactancia. Se contó con el aval de los productores y médicos veterinarios de los establecimientos lecheros de procedencia, ubicados en la zona rural cercanos a la FCV-UNL.

En todos los casos se realizó una anamnesis de los animales y el rodeo. Se registraron los datos de alimentación, condición corporal y producción láctea de los animales de ambos grupos.

5.2.1.1.1. Grupo control

El grupo control fue sometido al protocolo de sincronización G6G-Ovsynch detallado en el capítulo 1, y las muestras fueron tomadas en proestro (día 18 del protocolo). Se realizó la aspiración del líquido folicular del folículo preovulatorio a 30 vacas controles en total. Se realizó la ovariectomía a 10 de estas vacas.

5.2.1.1.2. Grupo EQO

Se realizó la identificación de casos de EQO espontánea a través de controles reproductivos de rutina en rodeos comerciales de la zona, y se tomaron muestras de los animales con alteraciones ováricas compatibles con EQO, tal como fue descripto en el

capítulo 1 (Silvia y col, 2002; Bartolomé y col., 2005). Se realizó la aspiración del líquido folicular a 39 vacas con EQO en total. La ovariectomía se realizó a 10 de estas vacas.

5.2.1.2. Obtención de muestras

Las muestras se obtuvieron según lo descripto en el capítulo 1 para los dos grupos en estudio. Se tomaron muestras de líquido folicular mediante la aspiración por sonda intravaginal y muestras de ovario completo mediante ovariectomía por flanco (técnicas descriptas en el capítulo 1) de ambos grupos (control y EQO). Las muestras de sangre obtenidas de vacas controles y de vacas con EQO se colocaron en tubos con EDTA y se conservaron en frío hasta su procesamiento en el laboratorio, para la obtención de plasma.

5.2.2. Procesamiento de muestras

Las muestras derivadas de los tres grupos (Control, EQO espontánea) fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA, ICiVet-Litoral, UNL-CONICET) como se describe en el capítulo 1. Las muestras procesadas en el laboratorio y su destino se observan en el esquema de la Figura 138.

TIPO DE MUESTRA	GRUPO	DESTINO
Ovario completo	⇒ CONTROL ⇒ EQO	IHQ INDIRECTA
Aspiración folicular: líquido folicular	⇒ CONTROL ⇒ EQO	MEDICIONES HORMONALES/ METABÓLICAS
Sangre: plasma	⇒ CONTROL ⇒ EQO	

Figura 138: Esquema de la procedencia y destino de las muestras obtenidas.

5.2.3. Detección y cuantificación de metabolitos en plasma y líquido folicular

Las concentraciones de AGNE, glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma y líquido folicular se determinaron usando un kits comerciales (AGNE: Randox Laboratories Ltd., Reino Unido, las restantes: Wiener Lab., Argentina). Las reacciones se evaluaron mediante espectrofotometría con un equipo SPECTROstar Nano (BGM LABTECH, Ortemberg, Alemania). Las concentraciones de BHB fueron medidas en sangre entera (al momento de la extracción de sangre) y líquido folicular empleando tiras reactivas (FreeStyle 210 Optium Xceed, Abbott Diabetes Care Ltd., Oxon, Reino Unido).

5.2.4. Detección y cuantificación de adiponectina, sus receptores e intermediarios

5.2.4.1. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Las concentraciones de adiponectina en plasma y líquido folicular en todas las vacas se cuantificaron usando un kit de ELISA comercial (LifeSpan BioSciences, Inc., USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todas las muestras de plasma y líquido folicular fueron diluidas 1:100 en PBS (Buffer Fosfato Salino) 0,01 M pH: 7-7,2, previo a la realización del ensayo. Posteriormente, las muestras se llevaron a una dilución final de 1:1000 usando el diluyente de muestra provisto en el kit. Las muestras de plasma, líquido folicular y patrones se colocaron por duplicado en los pocillos de la placa ya sensibilizada (provista por el kit) y se incubaron a 37°C durante dos horas. Pasado el tiempo indicado se escurrió la placa, se agregó el anticuerpo de detección (conjugado con biotina) y se incubó durante 1 h a 37 °C. Luego se lavó, se añadió estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa y se incubó durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se lavó y la reacción fue evidenciada utilizando TMB como cromógeno. La reacción se detuvo con solución de H₂SO₄ 0,16 M y se realizó la lectura a 450 nm en un lector de ELISA (Microplate Reader, SPECTROstarNano, BGM/LABTECH, Ortemberg, Alemania). El rango de detección fue de 78,13 pg/ml a 5000 pg/ml.

5.2.4.2. Western blot

Al igual que en los capítulos anteriores, esta técnica se realizó para comprobar la especificidad de los anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica. Para ello utilizamos ovarios de frigorífico, como se describe en el capítulo 1. En la Tabla 8 se detallan las condiciones utilizadas para los diferentes anticuerpos. La técnica completa fue descrita en el capítulo 1.

Además, se realizó el análisis BLAST (análisis de homología de las proteínas contra las cuales se usan anticuerpos reactivos para especies diferentes a la de *Bos taurus*) para todos los anticuerpos utilizados, arrojando resultados de homología entre 89% y 97%.

Tabla 8: Anticuerpos, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de Western blot.

Anticuerpo primario	Dilución	PM	Anticuerpo secundario	Dilución
AdipoR1 Policlonal (sc-46748, Santa Cruz)	1/500	49 kDa	Donkey anti-goat IgG HRP (sc-2020, Santa Cruz)	1/40.000
AdipoR2 Policlonal (sc-46754, Santa Cruz)	1/100	44 kDa	Donkey anti-goat IgG HRP (sc-2020, Santa Cruz)	1/40.000
AMPK Policlonal (sc-25792, Santa Cruz)	1/500	63 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1/7.500
CPT1 Policlonal (sc-20669, Santa Cruz)	1/250	63 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1/10.000
ACOX1 Policlonal (sc-98499, Santa Cruz)	1/500	74 kDa	Goat anti-rabbit- IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz)	1/10.000

5.2.4.3. Inmunohistoquímica indirecta

En la Tabla 9 se detallan las condiciones utilizadas para los diferentes anticuerpos utilizados. La técnica completa fue descrita en el capítulo 1. Para realizar el análisis sistemático de los folículos presentes en el ovario utilizamos la clasificación específica para la especie bovina descrita por Braw-Tal y Yossefi (1997), como se

detalla en el capítulo 1, clasificando a los folículos en: primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG) y antrales (A). Además de la clasificación mencionada, para el caso del grupo EQO, los folículos quísticos (Q) fueron identificados al examen histopatológico. Se definieron como estructuras foliculares con un antro evidente, un número variable de capas de células de la granulosa y con pérdida parcial de la estructura de la membrana basal, sin signos de luteinización en las poblaciones celulares analizadas (granulosa y teca) (Silvia y col., 2002; Monniaux y col., 2008).

El análisis de imágenes, y los análisis estadísticos entre los grupos se detallan en el capítulo 1.

Tabla 9: Anticuerpos, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario	Condiciones	Recuperación antigénica	Tipo de bloqueo	Anticuerpo secundario
AdipoR1 Policlonal (sc-46748, Santa Cruz)	1/100 Toda la noche a 4°C	Microondas convencional	Suero normal de burro al 10%	Donkey anti-goat IgG (Santa Cruz)
AdipoR2 Policlonal (sc-46754, Santa Cruz)	1/50 Toda la noche a 4°C	Intensa en microondas	Suero normal de burro al 10%	Donkey anti-goat IgG (Santa Cruz)
AMPK Policlonal (sc-25792, Santa Cruz)	1/500 Toda la noche a 4°C	Olla a presión	Suero normal de cabra al 10%	Goat anti-rabbit IgG biotinilado (sc- 2040, Santa Cruz)
CPT1 Policlonal (sc-20669, Santa Cruz)	1/50 Toda la noche a 4°C	Sin recuperación	Suero normal de cabra al 10%	Secundario universal (CytoScan HRP detection system- Cell Marque)
ACOX1 Policlonal (sc-98499, Santa Cruz)	1/800 Toda la noche a 4°C	Microondas convencional	Suero normal de cabra al 10%	Secundario universal (CytoScan HRP detection system- Cell Marque)

5.2.5. Evaluación estadística

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 15.0.1 para Windows (Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las pruebas de homogeneidad de la varianza entre grupos se realizó mediante un test de Levene y la normalidad se verificó por el test de Kolmogorov-Smirnov.

Las concentraciones plasmáticas y en líquido folicular de AGNE, glucosa, triglicéridos, BHB, colesterol y adiponectina en los animales controles y EQO fueron

comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan.

Para evaluar la expresión proteica mediante inmunohistoquímica, se realizó un análisis de la varianza de los datos aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan. Se analizaron por separado las estructuras foliculares análogas (folículos primarios, preantrales pequeños y grandes, y antrales) de cada grupo en estudio. También se compararon los quistes espontáneos con los folículos antrales del grupo control (como estructuras de referencia). Además, se evaluó el comportamiento de la expresión proteica a lo largo de la foliculogénesis dentro de cada grupo en estudio. La comparación entre dos grupos de muestras se realizó mediante la prueba t-Student.

Para todos los análisis estadísticos, un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo. Los valores se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM).

5.3. CAPÍTULO III:

Resultados

5.3.1. Identificación y caracterización de los animales con EQO

Los establecimientos de los cuales obtuvimos las muestras se caracterizan por ser sistemas pastoriles (principalmente alfalfa) con suplementación (energética y proteica); en la zona se utiliza principalmente expeller de soja, grano de maíz y silaje de maíz.

La estimación de la CC en vacas lecheras es un indicador de la cantidad de reservas energéticas y sustituye a la medición del peso corporal. Mediante este método se prescinde del uso de una balanza, como así también de las variaciones individuales del rodeo, tales como el estado de preñez y las diferencias en el frame (tamaño corporal). Una adecuada CC en los bovinos varía según la etapa del ciclo productivo en la que se encuentre, y es importante al parto la vaca no llegue con una CC excesiva, ya que podría conducir a complicaciones sanitarias posteriores. Al respecto, la CC de los animales estudiados osciló entre 2 y 4 puntos, de acuerdo a la escala de 1 a 5 (Edmonson y col., 1989), sin encontrarse diferencias entre ambos grupos ($p > 0,05$) (Figura 139).

<i>Grupo</i>	<i>Condición corporal (Promedio±EEM)</i>
CONTROL	2,83±0,09
EQO	3,06±0,10

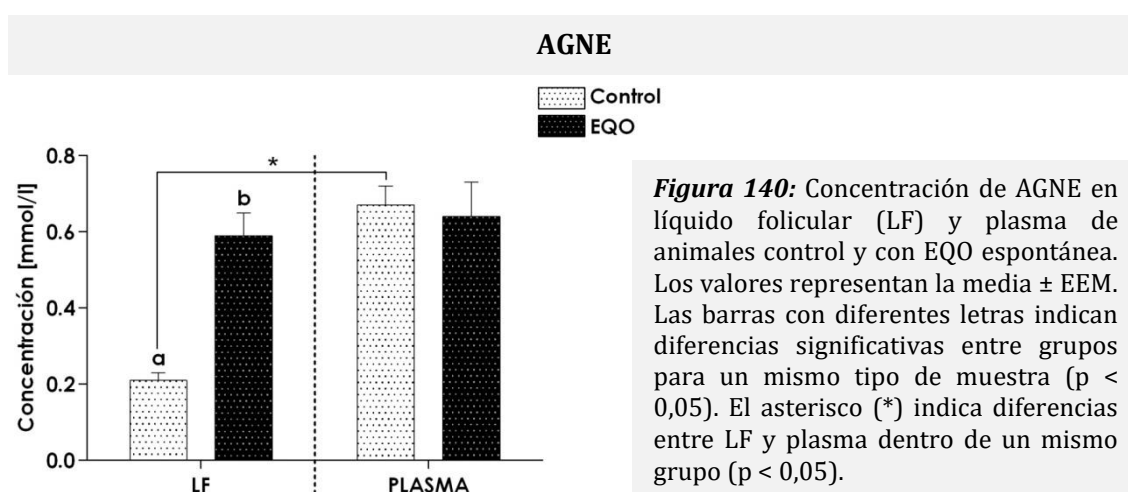
<i>Grupo</i>	<i>Producción láctea a 305 días (Promedio±EEM)</i>
CONTROL	8094,2 ± 840,6
EQO	8493,7 ± 320,0

Figura 139: Condición corporal y producción láctea a 305 días en ambos grupos (control y EQO).

Las vacas de ambos grupos son de alta producción, con lactancias promedio de 8094 litros para el grupo control y de 8494 litros para el grupo EQO. No se encontraron diferencias entre ambos grupos ($p > 0,05$) (Figura 139).

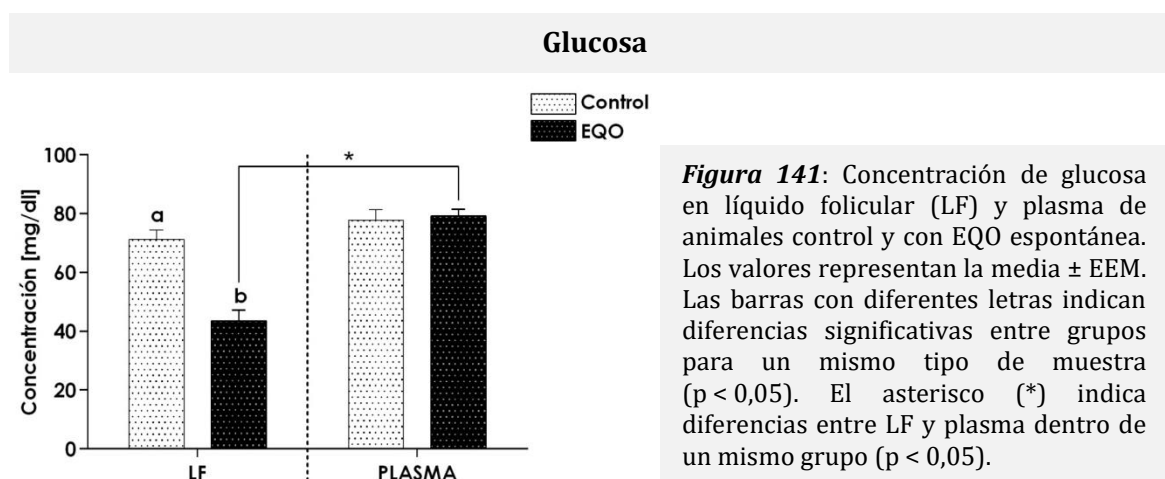
5.3.2. Concentración de AGNE en líquido folicular y plasma

Las concentraciones de AGNE se determinaron en líquido folicular de folículos preovulatorios y quistes, de animales de los grupos control y EQO espontánea, respectivamente, y en plasma de ambos grupos. Las concentraciones de AGNE fueron mayores en líquido folicular de quistes respecto a los folículos preovulatorios ($p < 0,05$). En plasma, las concentraciones de AGNE fueron similares entre ambos grupos ($p > 0,05$). Comparando las concentraciones de AGNE entre líquido folicular y plasma de un mismo grupo, se determinó que en el grupo control los niveles fueron mayores en plasma que en líquido folicular ($p < 0,05$) (Figura 140).



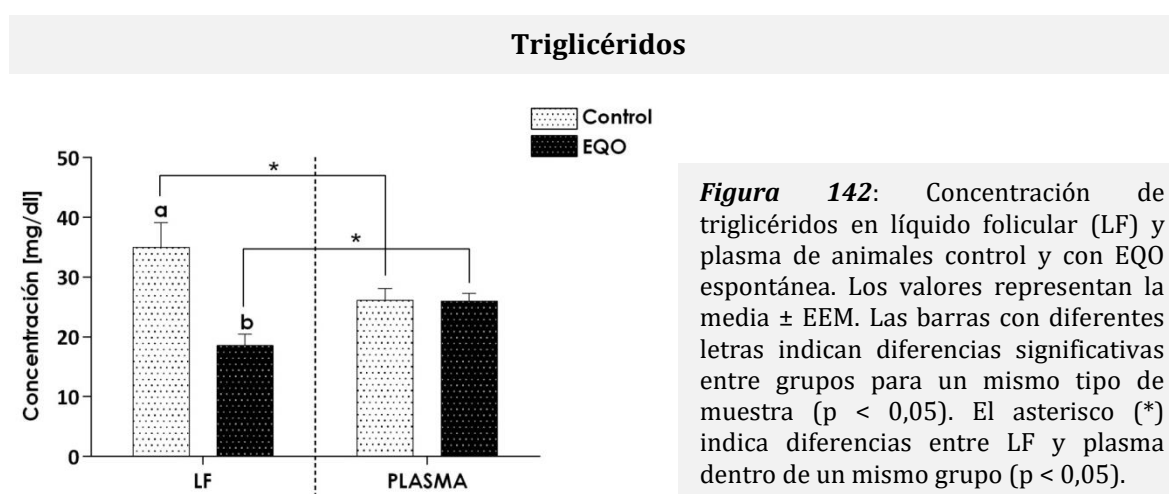
5.3.3. Concentración de glucosa en líquido folicular y plasma

Las concentraciones de glucosa se determinaron en líquido folicular de folículos preovulatorios y quistes, de animales de los grupos control y EQO espontánea, respectivamente, y en plasma de ambos grupos. Las concentraciones de glucosa fueron mayores en líquido folicular de folículos preovulatorios controles que en quistes ($p < 0,05$). En plasma, las concentraciones de glucosa fueron similares entre ambos grupos ($p > 0,05$). Comparando las concentraciones de glucosa entre líquido folicular y plasma de un mismo grupo, se determinó que en el grupo EQO los niveles fueron mayores en plasma que en líquido folicular ($p < 0,05$) (Figura 141).



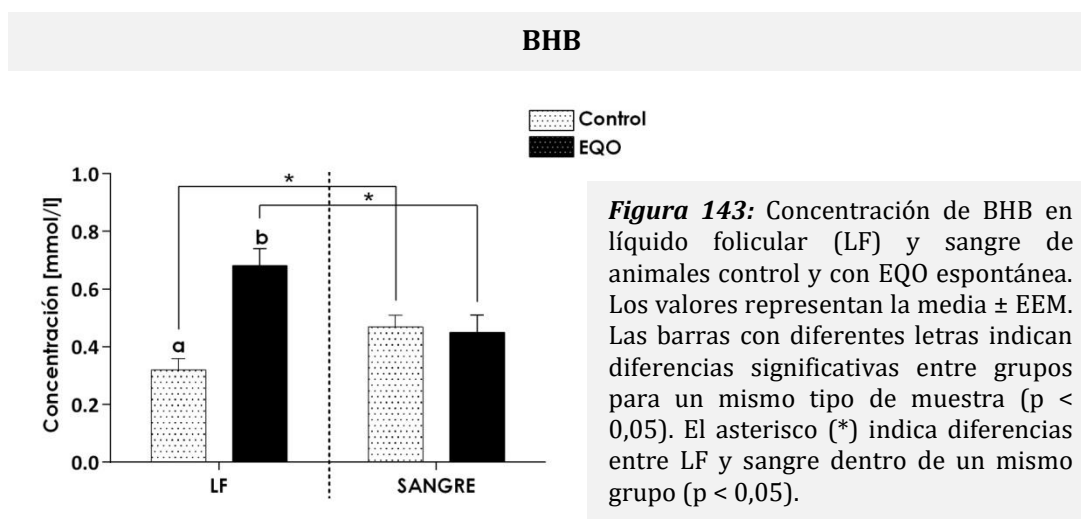
5.3.4. Concentración de triglicéridos en líquido folicular y plasma

Las concentraciones de triglicéridos se determinaron en líquido folicular de folículos preovulatorios y quistes, de animales de los grupos control y EQO espontánea, respectivamente, y en plasma de ambos grupos. Las concentraciones de triglicéridos fueron mayores en líquido folicular de folículos preovulatorios controles que en quistes ($p < 0,05$). En plasma, no se evidenciaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$). Comparando las concentraciones de triglicéridos entre líquido folicular y plasma de un mismo grupo, se determinó que en el grupo EQO los niveles fueron mayores en plasma que en líquido folicular ($p < 0,05$), en cambio, en el grupo control los niveles fueron mayores en líquido folicular que en plasma ($p < 0,05$) (Figura 142).



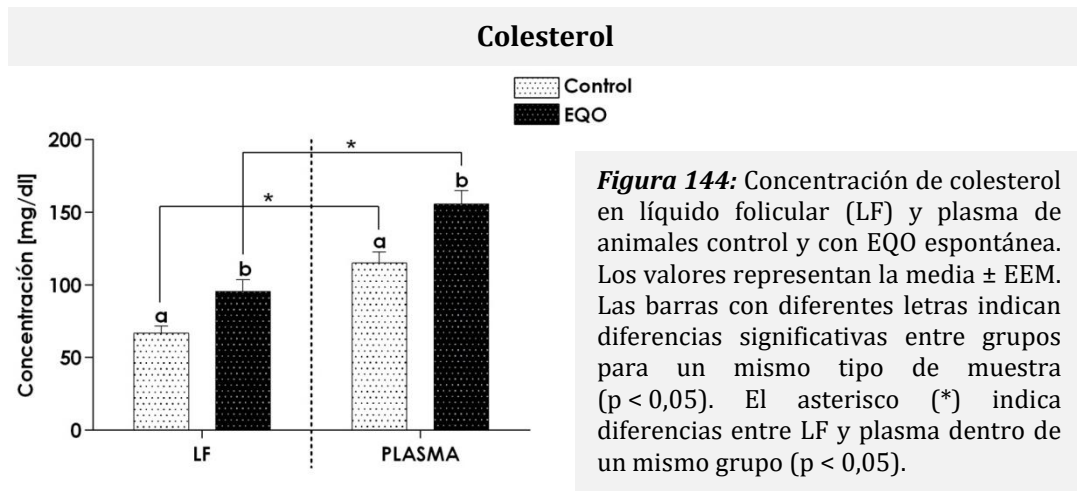
5.3.5. Concentración de BHB en líquido folicular y sangre

Las concentraciones de BHB se determinaron en líquido folicular de folículos preovulatorios y quistes, de animales de los grupos control y EQO espontánea, respectivamente, y en sangre entera de ambos grupos. Las concentraciones de BHB fueron mayores en líquido folicular de quistes respecto a los folículos preovulatorios controles ($p < 0,05$). En sangre, no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$). Comparando las concentraciones de BHB entre líquido folicular y sangre de un mismo grupo, se determinó que en el grupo EQO los niveles fueron mayores en líquido folicular ($p < 0,05$), en cambio, en el grupo control los niveles fueron mayores en sangre ($p < 0,05$) (Figura 143).



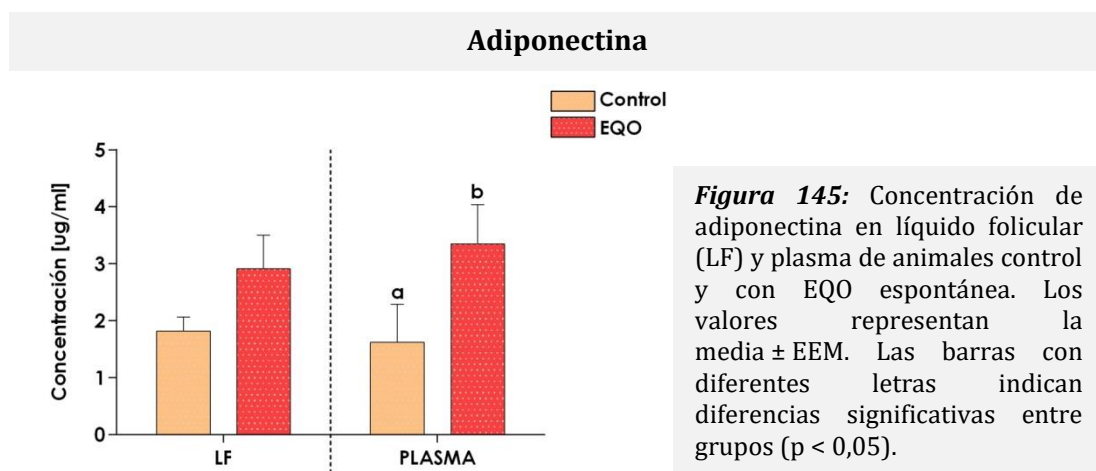
5.3.6. Concentración de colesterol en líquido folicular y plasma

Las concentraciones de colesterol se determinaron en líquido folicular de folículos preovulatorios y quistes, de animales de los grupos control y EQO espontánea, respectivamente, y en plasma de ambos grupos. Las concentraciones de colesterol fueron mayores tanto en líquido folicular como en plasma de vacas quísticas respecto a vacas controles ($p < 0,05$). Cuando comparamos las concentraciones de colesterol entre líquido folicular y plasma de un mismo grupo, se determinó que en ambos grupos los niveles fueron mayores en plasma que en líquido folicular ($p < 0,05$) (Figura 144).



5.3.7. Concentración de adiponectina en líquido folicular y plasma

Las concentraciones de adiponectina se determinaron en líquido folicular de folículos preovulatorios y quistes, de animales de los grupos control y EQO espontánea, respectivamente, y en plasma de ambos grupos. Se hallaron diferencias en la concentración plasmática de adiponectina entre animales control y con EQO, siendo mayor en animales con EQO ($p < 0,05$). En líquido folicular, las concentraciones de adiponectina fueron similares entre ambos grupos ($p > 0,05$) (Figura 145).



5.3.8. Expresión y localización proteica de AdipoR1, AdipoR2 y AMPK

La expresión proteica de AdipoR1, AdipoR2 y AMPK fue detectada y localizada en las células de la granulosa y de la teca por inmunohistoquímica. Los controles negativos no evidenciaron marcación. La corroboración de la especificidad de los anticuerpos usados para inmunohistoquímica se realizó mediante western blot. De esta manera se confirmó que los anticuerpos para las proteínas evaluadas se unieron específicamente y no generaron reacciones cruzadas, como se muestra en las Figuras 147, 152, 157, 162 y 167.

5.3.8.1. Expresión proteica y localización de AdipoR1

La expresión de AdipoR1 fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los folículos y grupos analizados (Figura 147, 148 Y 150).

5.3.8.1.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

En el grupo control no se determinaron diferencias entre las distintas categorías foliculares durante la foliculogénesis en ninguna de las poblaciones celulares (granulosa y teca interna) ($p > 0,05$) (Figura 146 Y 147).

En las células de la granulosa del grupo EQO la expresión proteica de AdipoR1 fue mayor en folículos primarios respecto a los folículos preantrales pequeños, folículos antrales y quistes ($p < 0,05$). Del mismo modo los folículos preantrales grandes mostraron mayor expresión que los folículos preantrales pequeños y quistes ($p < 0,05$). En células de la teca no se determinaron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Figura 146 Y 148).

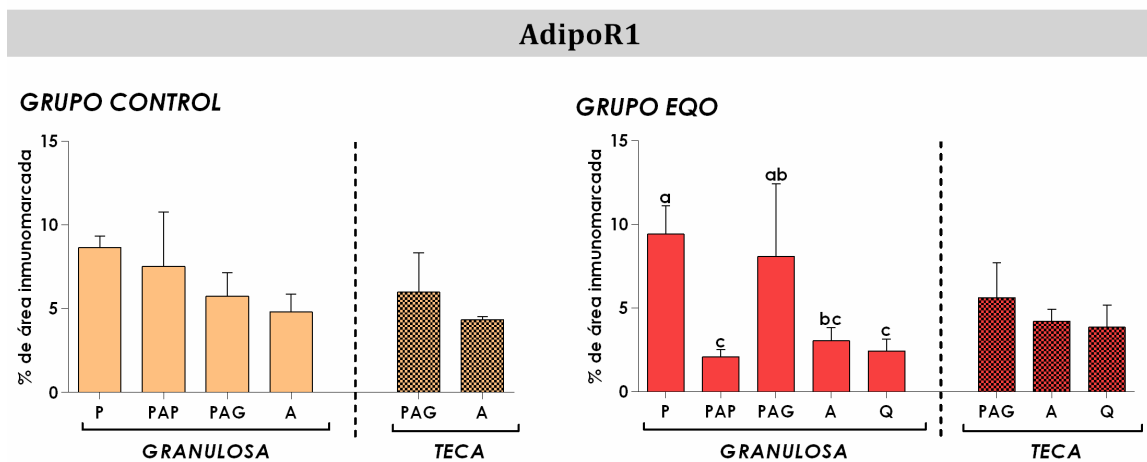


Figura 146: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AdipoR1 en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

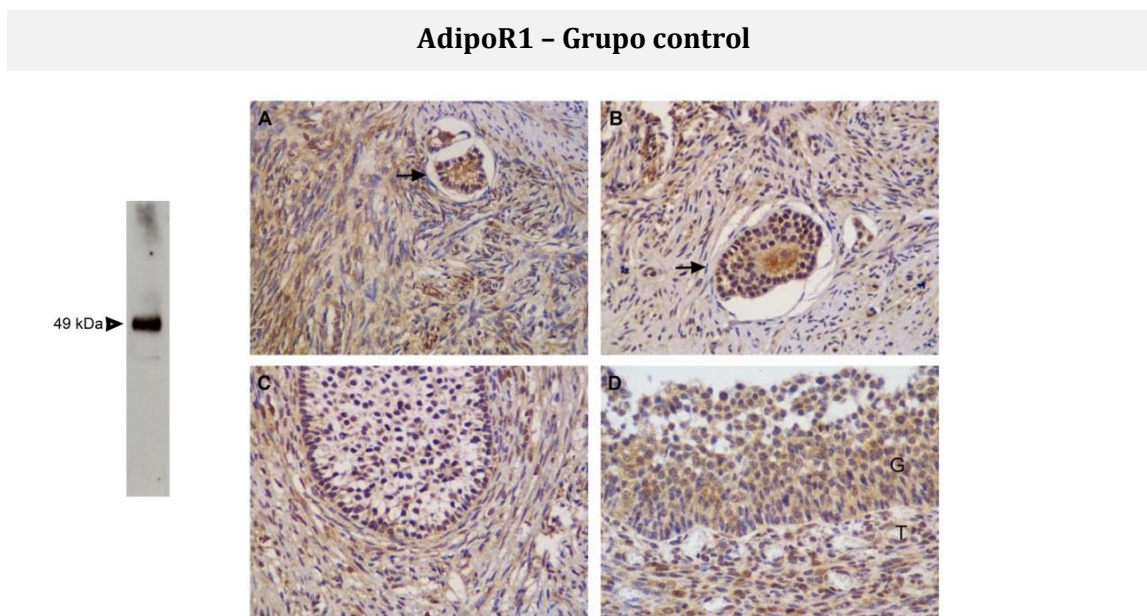


Figura 147: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AdipoR1 en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 49 KDa correspondientes a AdipoR1. Magnificación 400 X.

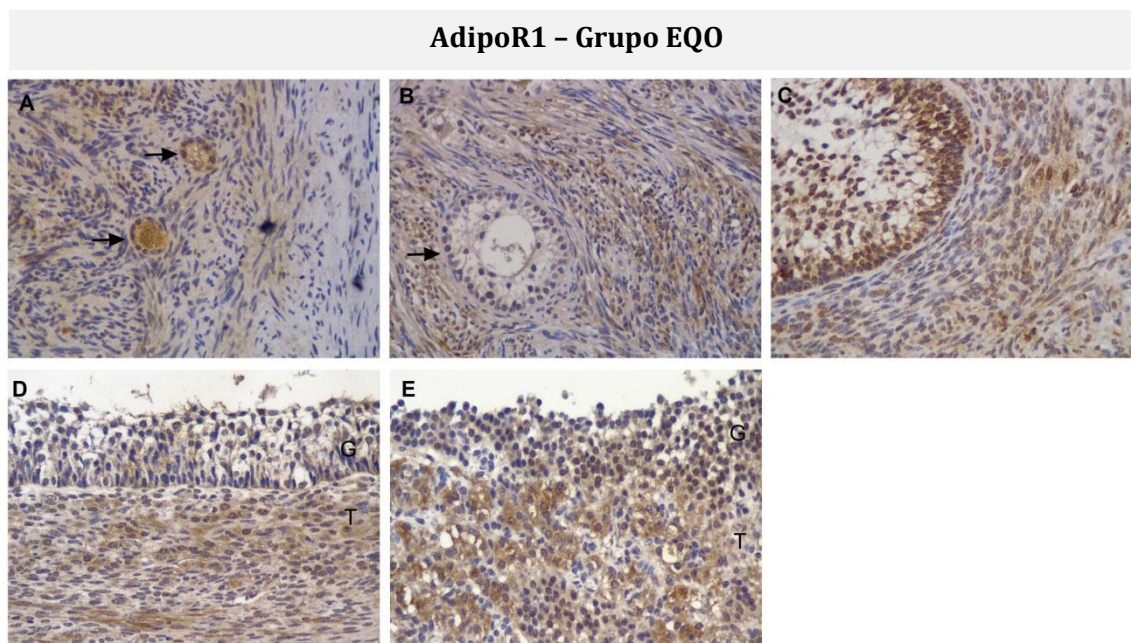


Figura 148: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AdipoR1 en diferentes categorías foliculares del grupo EQO. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Quiste folicular. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

5.3.8.1.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

Los niveles de expresión de AdipoR1 fueron similares tanto en las células de la granulosa como en las células de la teca para todas las categorías ($p > 0,05$) (Figuras 149 Y 150).

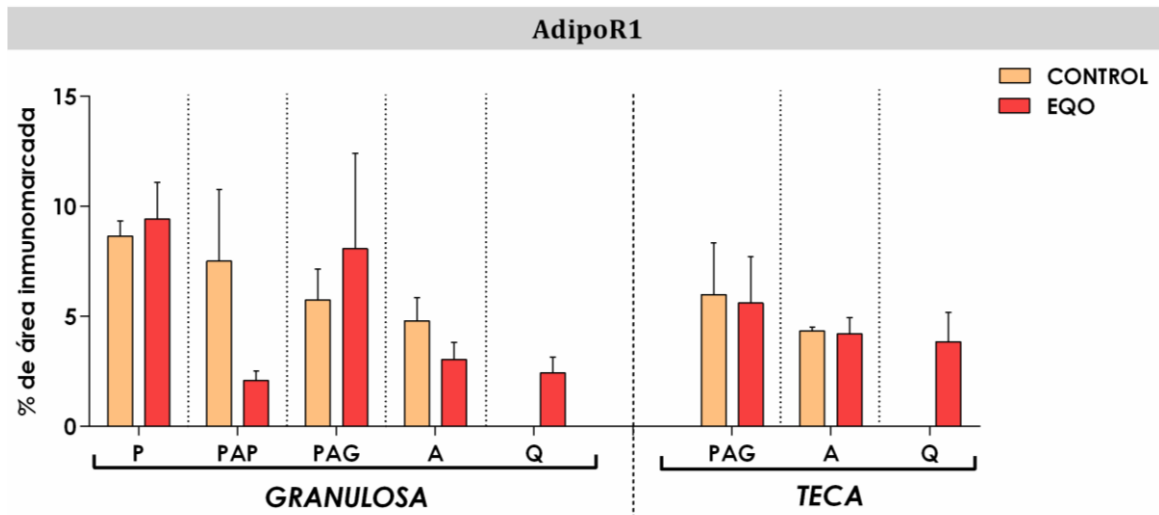


Figura 149: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AdipoR1 en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) de los grupos control y EQO. Los valores representan la media \pm EEM.

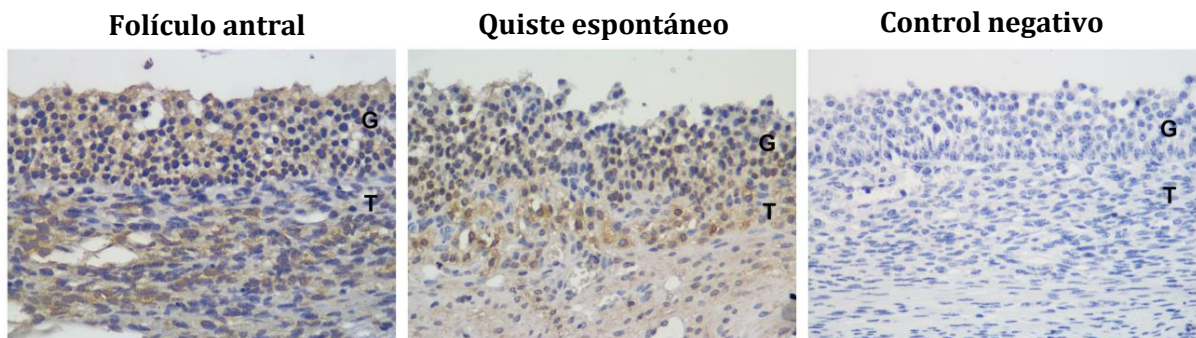


Figura 150: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AdipoR1 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO). G: Células de la granulosa. T: Células de la teca. El control negativo de inmunohistoquímica se muestra en la imagen de la derecha. Magnificación 400x.

5.3.8.2. Expresión proteica y localización de AdipoR2

La expresión de AdipoR2 fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los folículos y grupos analizados (Figuras 152, 153 y 154).

5.3.8.2.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

En células de la granulosa del grupo control la expresión de AdipoR2 fue mayor en los folículos primarios y preantrales pequeños en relación a los folículos antrales ($p < 0,05$). En las células de teca no se observaron diferencias significativas entre las distintas categorías foliculares ($p > 0,05$) (Figuras 151 y 152).

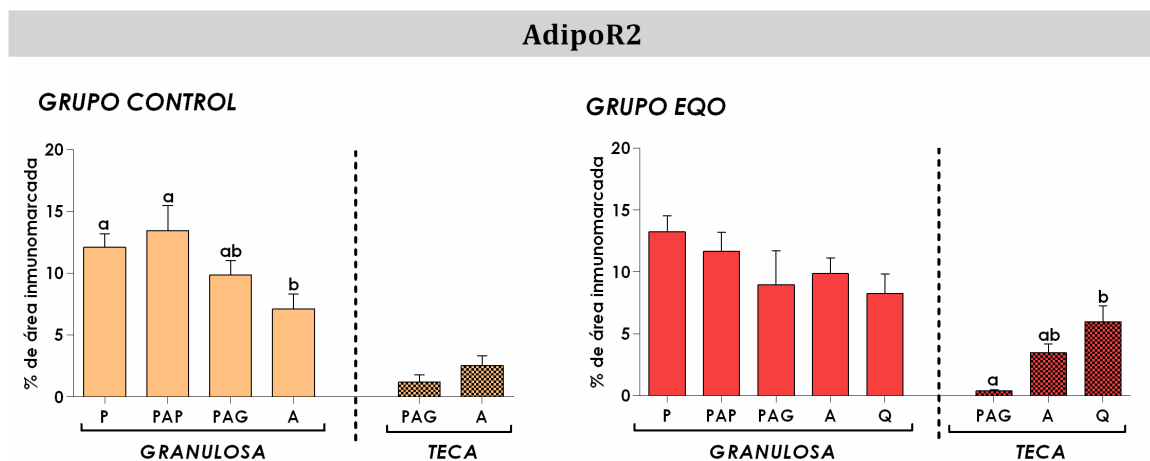


Figura 151: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AdipoR2 en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En células de la granulosa del grupo EQO la expresión proteica de AdipoR2 fue similar a lo largo de la foliculogénesis ($p > 0,05$). En las células de teca la expresión fue menor en los folículos preantrales grandes respecto a los folículos quísticos ($p < 0,05$) (Figuras 151 y 153).

AdipoR2 - Grupo control

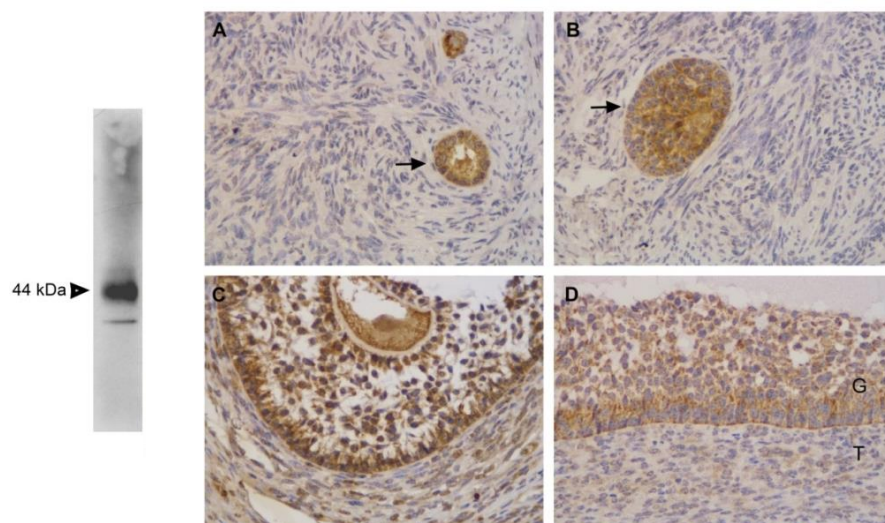


Figura 152: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AdipoR2 en diferentes categorías foliculares del grupo control. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. La especificidad del anticuerpo se muestra por western blot a la izquierda, observándose una banda a la altura de 44 KDa correspondientes a AdipoR2. Magnificación 400 X.

AdipoR2 - Grupo EQO

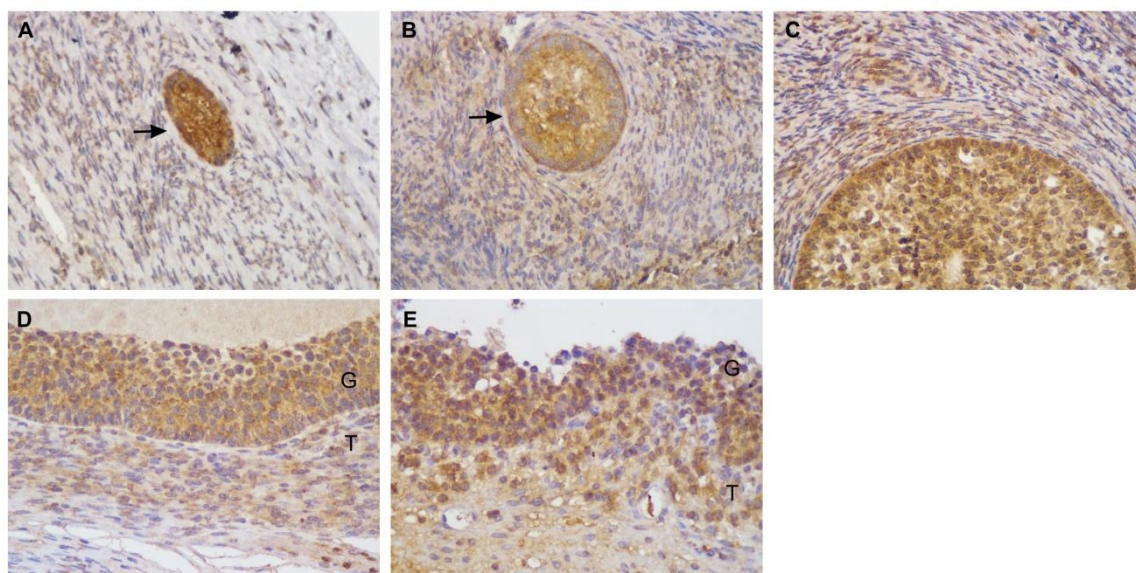


Figura 153: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AdipoR2 en diferentes categorías foliculares del grupo EQO. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Quiste folicular. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

5.3.8.2.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

Los niveles de expresión de AdipoR2 fueron similares en las células de la granulosa para todas las categorías foliculares ($p > 0,05$). En células de la teca se determinó una mayor expresión de AdipoR2 en folículos antrales del grupo control respecto a los folículos quísticos ($p < 0,05$) (Figuras 154 y 155).

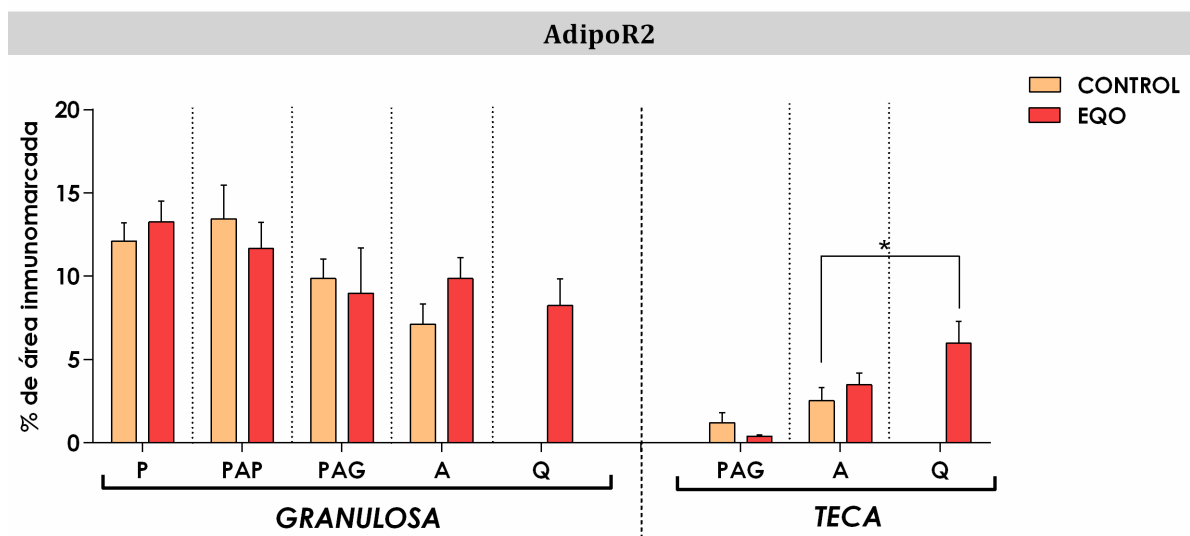


Figura 154: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AdipoR2 en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) de los grupos control y EQO. Los valores representan la media \pm EEM. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los folículos antrales del grupo control y los folículos quísticos ($p < 0,05$).

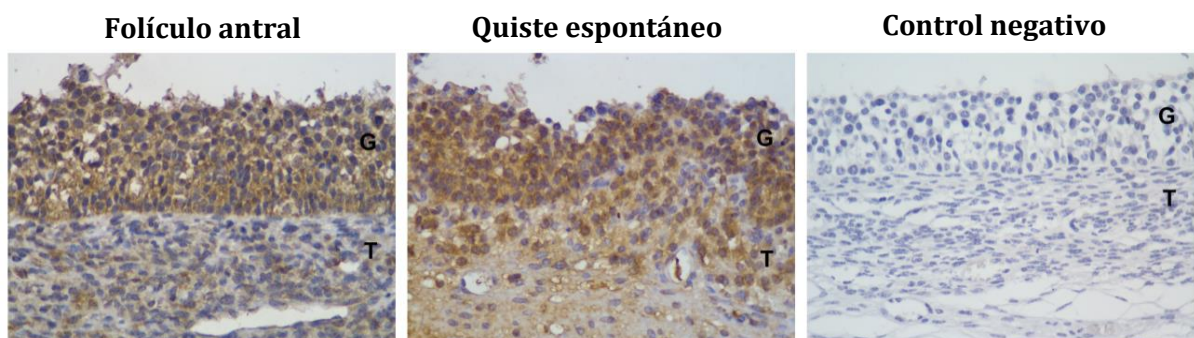


Figura 155: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AdipoR2 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO). G: Células de la granulosa. T: Células de la teca. El control negativo de inmunohistoquímica se muestra en la imagen de la derecha. Magnificación 400x.

5.3.8.3. Expresión proteica y localización de AMPK

La expresión de AMPK fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los folículos y grupos analizados (Figuras 157, 158 y 160).

5.3.8.3.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

En el grupo control no se determinaron diferencias entre las distintas categorías foliculares durante la foliculogénesis en ninguna de las poblaciones celulares (granulosa y teca interna) ($p > 0,05$) (Figuras 156 y 157).

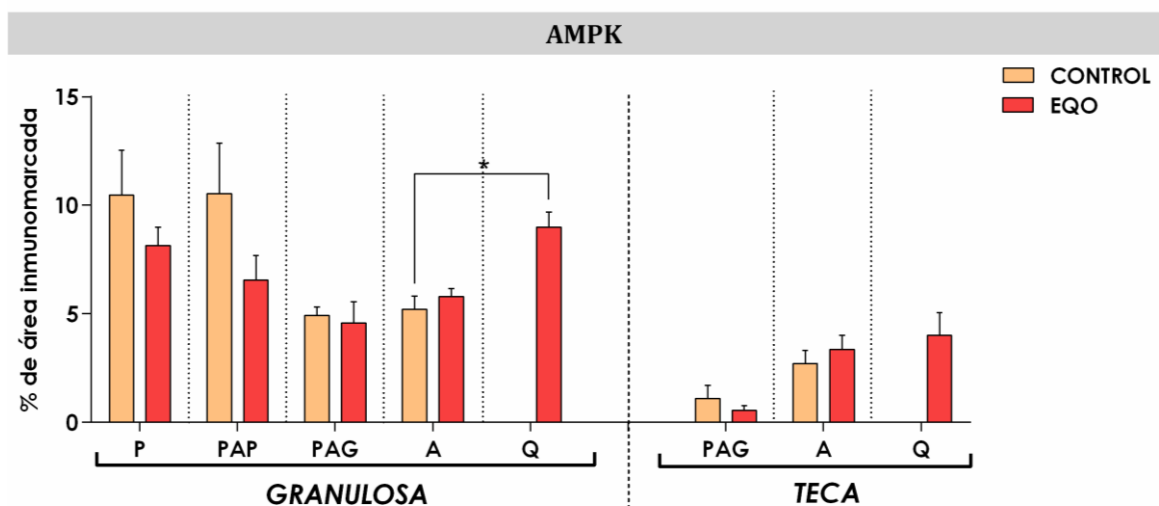
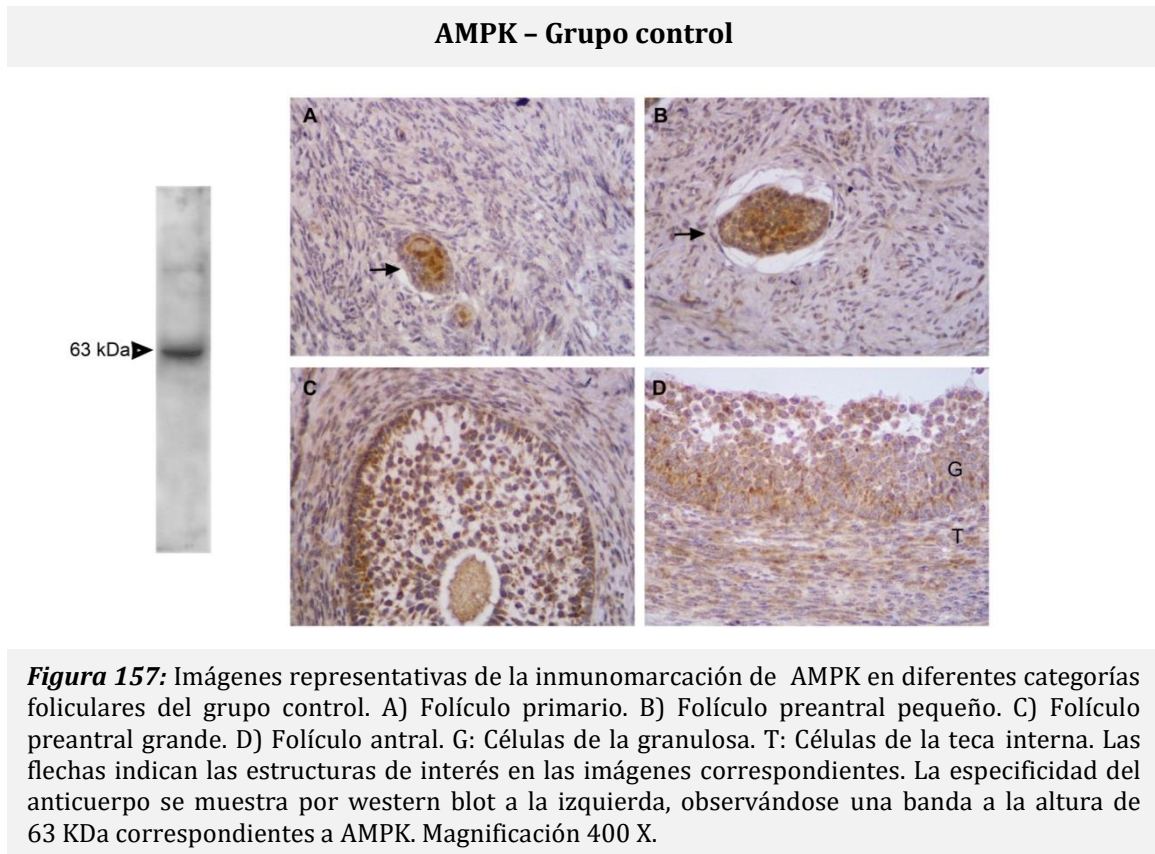


Figura 156: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMPK en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).



En las células de la granulosa, la expresión proteica de AMPK del grupo EQO fue mayor en los folículos quísticos respecto a las demás categorías foliculares ($p < 0,05$) aunque sin diferir respecto a los folículos primarios ($p > 0,05$). En las células de la teca, la expresión fue mayor en folículos antrales y quísticos respecto a los folículos preantrales grandes ($p < 0,05$) (Figuras 156 y 158).

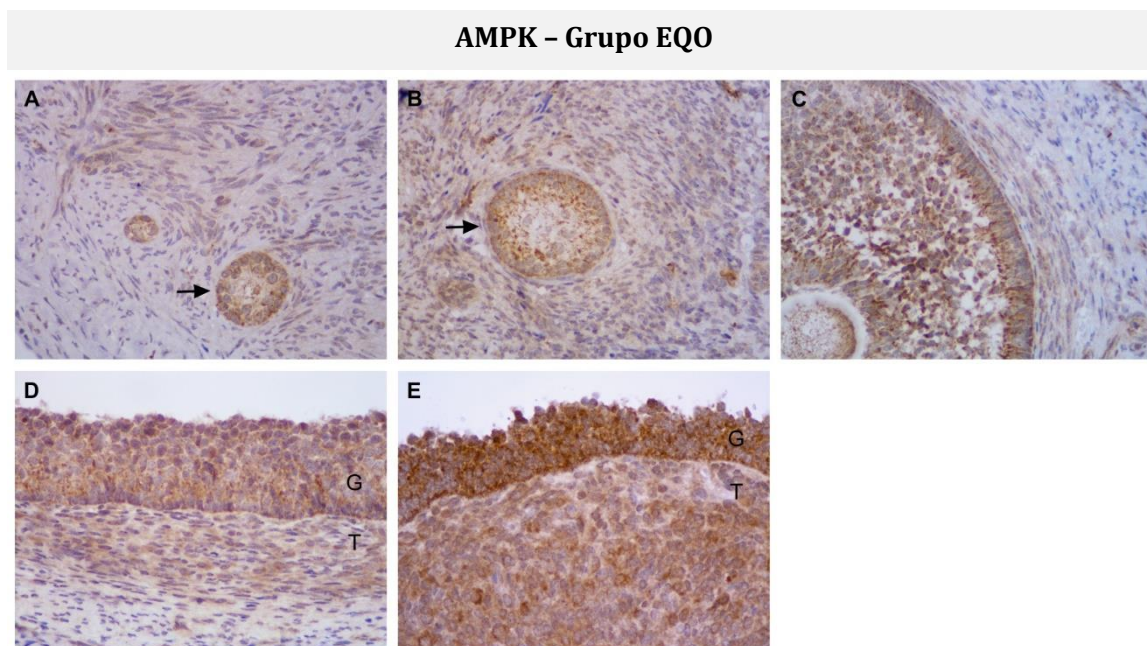


Figura 158: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AMPK en diferentes categorías foliculares del grupo EQO. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Quiste folicular. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

5.3.8.3.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

Los niveles de expresión de AMPK fueron similares en las células de la granulosa en la mayoría de las categorías foliculares ($p > 0,05$). Sin embargo, al comparar los quistes con los folículos antrales del grupo control se detectó una mayor expresión en este último ($p < 0,05$). En las células de la teca, los niveles de expresión de AMPK fueron similares en todas las categorías foliculares de ambos grupos ($p > 0,05$) (Figuras 159 y 160).

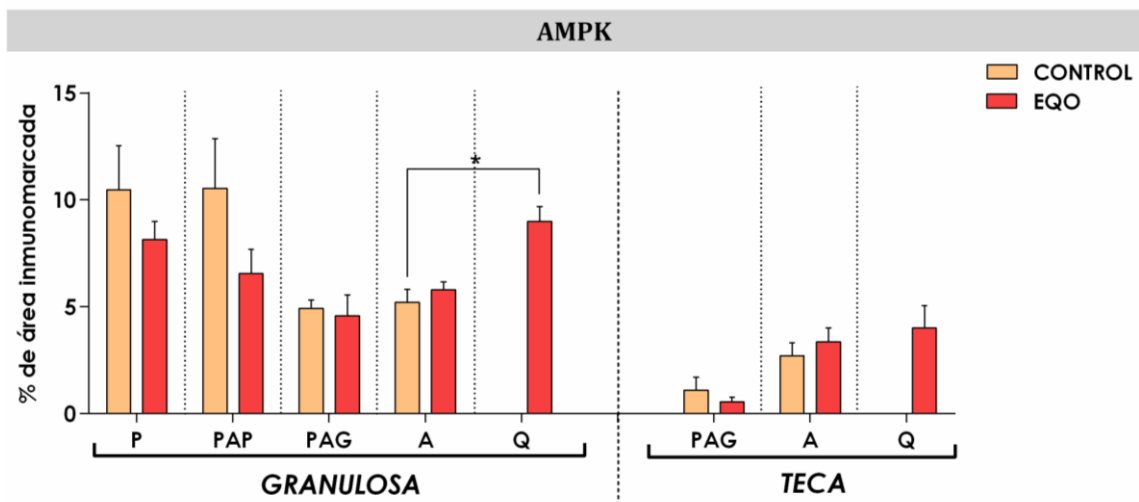


Figura 159: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMPK en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) de los grupos control y EQO. Los valores representan la media \pm EEM. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los folículos antrales del grupo control y los folículos quísticos ($p < 0,05$).

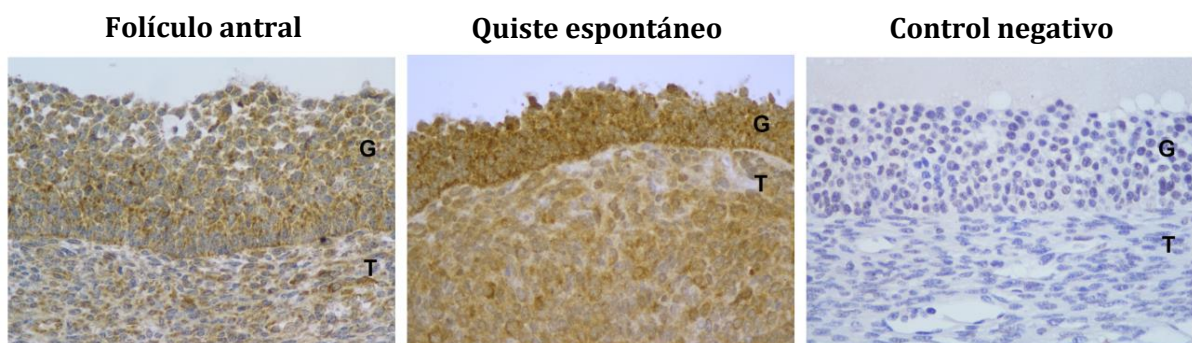


Figura 160: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AMPK en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO). G: Células de la granulosa. T: Células de la teca. El control negativo de inmunohistoquímica se muestra en la imagen de la derecha. Magnificación 400x.

5.3.9. Expresión y localización proteica CPT1 y ACOX1

La expresión proteica de CPT1 y ACOX1 fue detectada y localizada en las diferentes poblaciones celulares por inmunohistoquímica. Los controles negativos no evidenciaron marcación. La corroboración de la especificidad de los anticuerpos usados para inmunohistoquímica se realizó mediante western blot. De esta manera se confirmó que los anticuerpos contra las proteínas evaluadas se unieron a específicamente y no generaron reacciones cruzadas, como se muestra en las Figuras 162, 163 y 165.

5.3.9.1. Expresión proteica y localización de CPT-1

La expresión de CPT-1 fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los folículos y grupos analizados (Figuras 162, 163 y 165).

5.3.9.1.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

En células de la granulosa del grupo control la expresión de CPT1 fue disminuyendo con el desarrollo folicular, detectando mayor expresión en los folículos primarios en relación a los folículos preantrales grandes y antrales ($p < 0,05$). En las células de teca no se observaron diferencias significativas entre las categorías foliculares ($p < 0,05$) (Figuras 161 y 162).

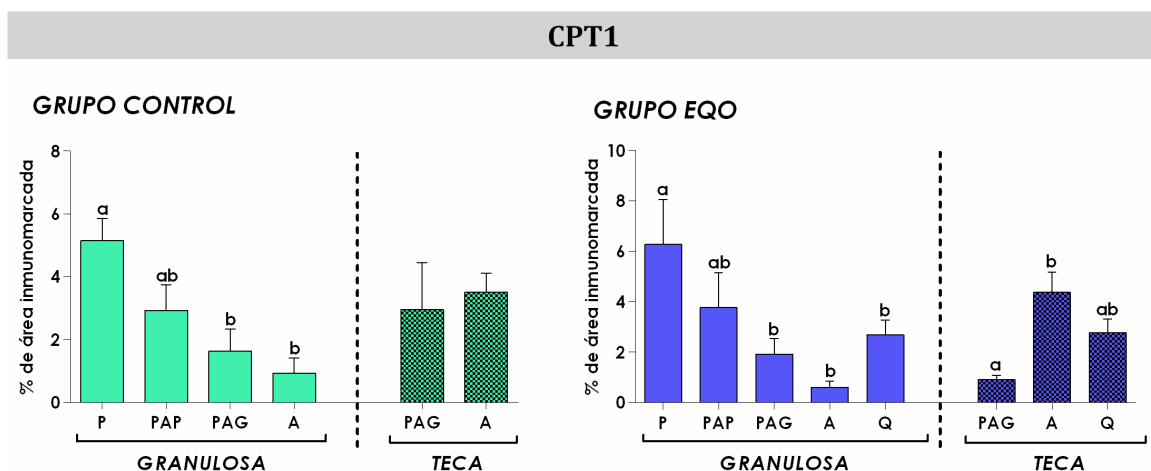
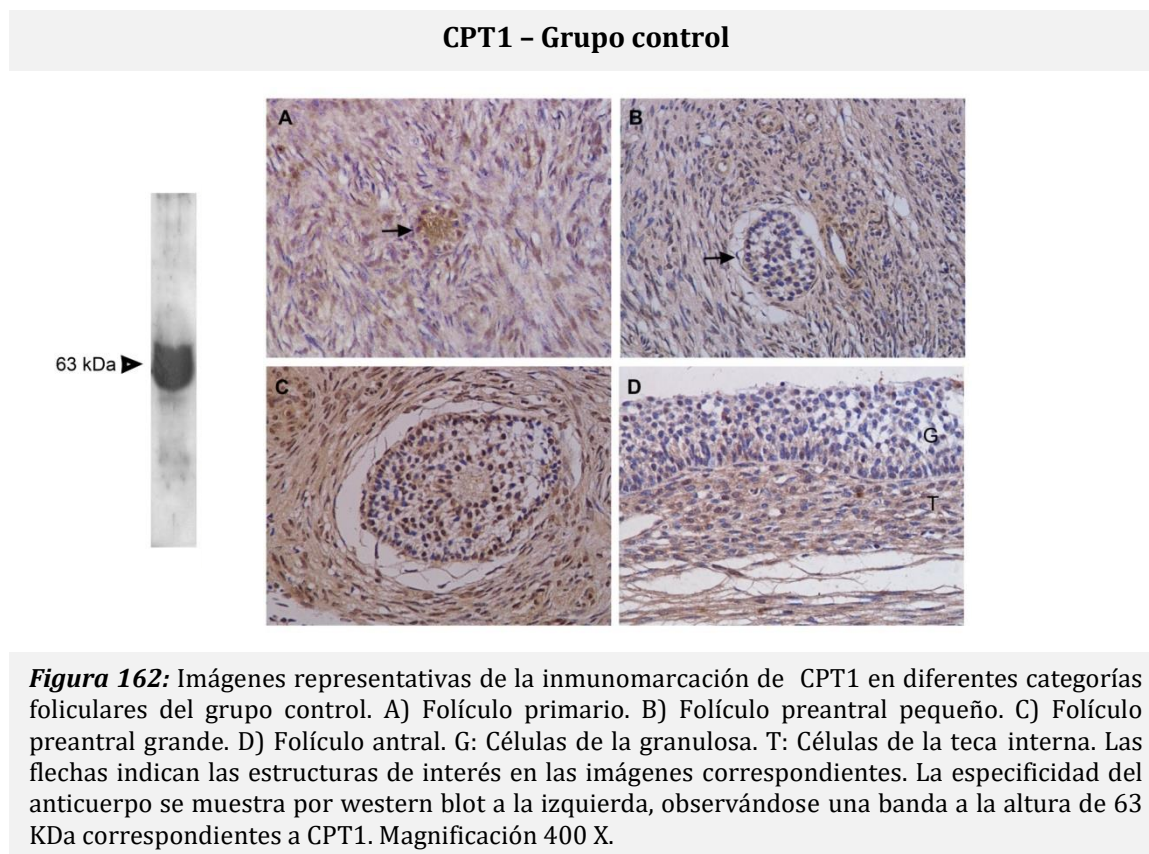
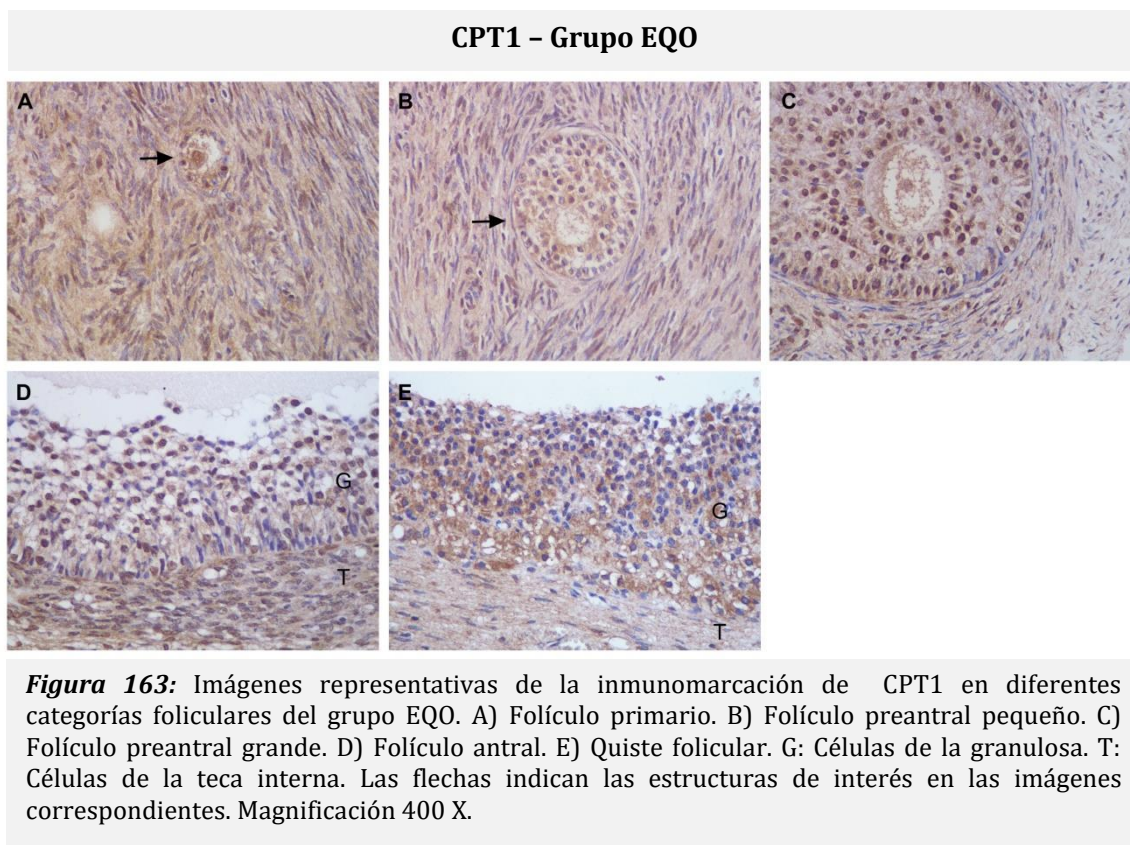


Figura 161: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de CPT1 en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).



En las células de la granulosa del grupo EQO, la expresión proteica de CPT1 siguió un patrón similar al grupo control, determinando una mayor expresión en los folículos primarios respecto a los folículos preantrales grandes, folículos antrales y quistes ($p < 0,05$). En las células de la teca la expresión fue mayor en folículos antrales respecto a folículos preantrales grandes ($p < 0,05$) (Figuras 161 y 163).



5.3.9.1.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

Los niveles de expresión de CPT1 fueron similares en las células de la granulosa en la mayoría de las categorías foliculares entre los grupos ($p > 0,05$). Sin embargo al comparar los quistes con los folículos antrales del grupo control se determinó una mayor expresión en los quistes foliculares ($p < 0,05$). En células de la teca la expresión de CPT1 fue similar en todas las categorías foliculares, entre ambos grupos ($p > 0,05$) (Figuras 164 y 165).

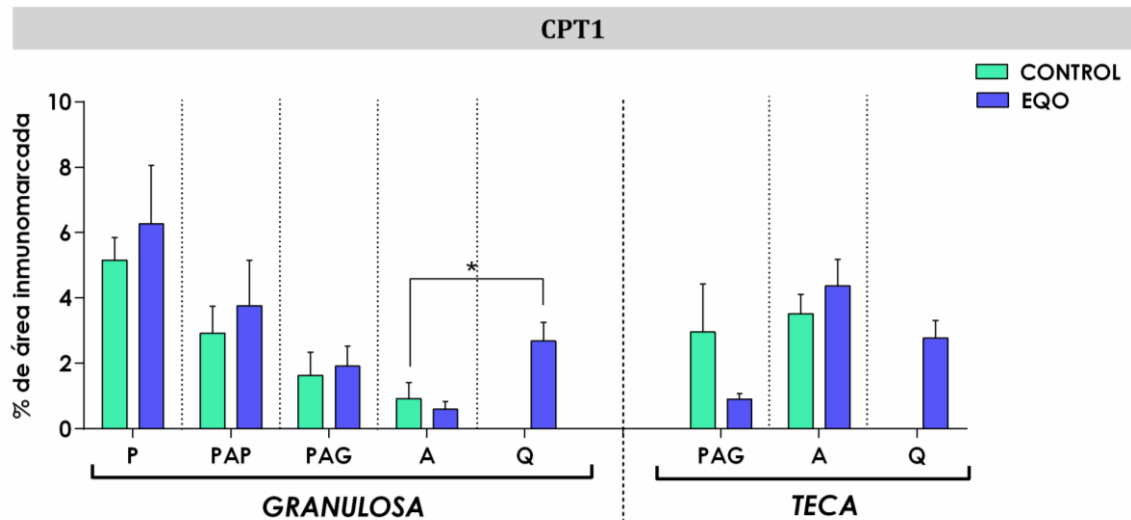


Figura 164: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de CPT1 en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) de los grupos control y EQO. Los valores representan la media \pm EEM. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los folículos antrales del grupo control y los folículos quísticos ($p < 0,05$).

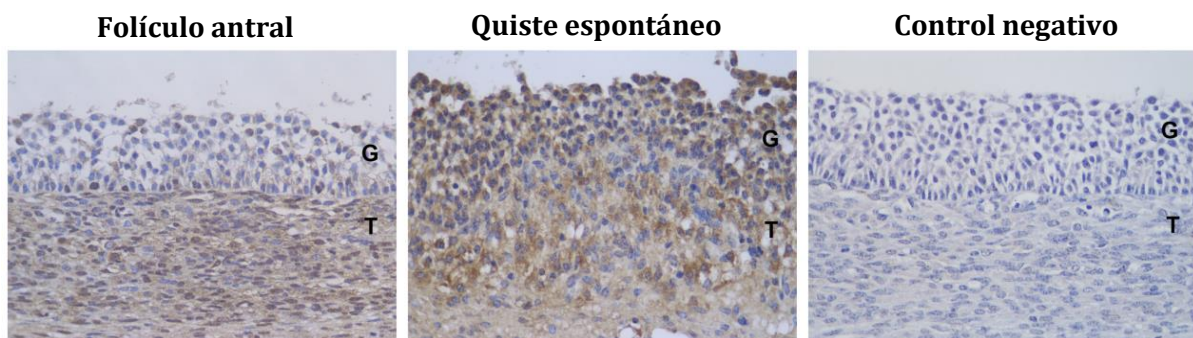


Figura 165: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CPT1 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO). G: Células de la granulosa. T: Células de la teca. El control negativo de inmunohistoquímica se muestra en la imagen de la derecha. Magnificación 400x.

5.3.9.2. Expresión proteica y localización de ACOX1

La expresión de ACOX1 fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los folículos y grupos analizados (Figuras 167, 168 y 170).

5.3.9.2.1. Análisis de foliculogénesis por grupo

En células de la granulosa del grupo control la expresión de ACOX1 fue mayor en los folículos primarios respecto a los folículos preantrales grandes y antrales ($p < 0,05$). En las células de la teca de expresión de ACOX1 fue similar en las categorías evaluadas ($p > 0,05$) (Figuras 166 y 167).

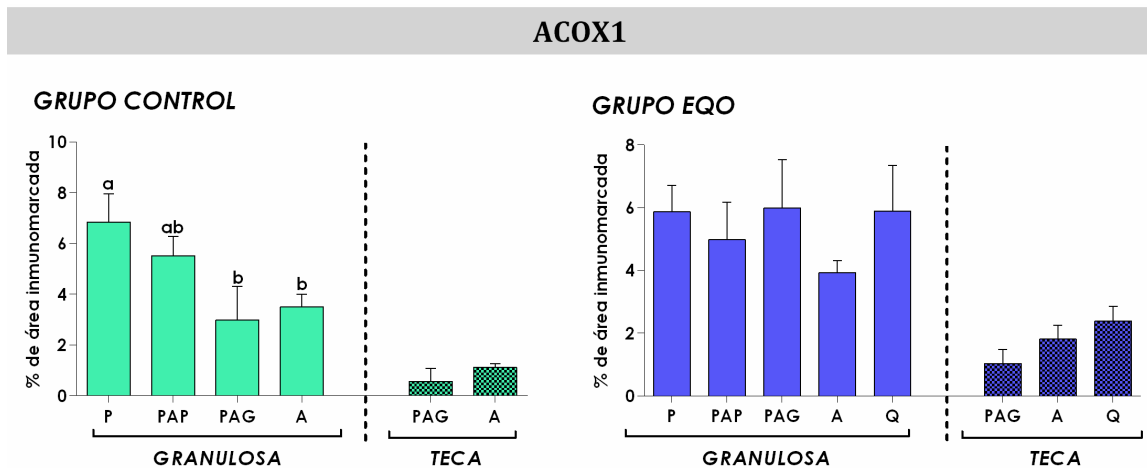
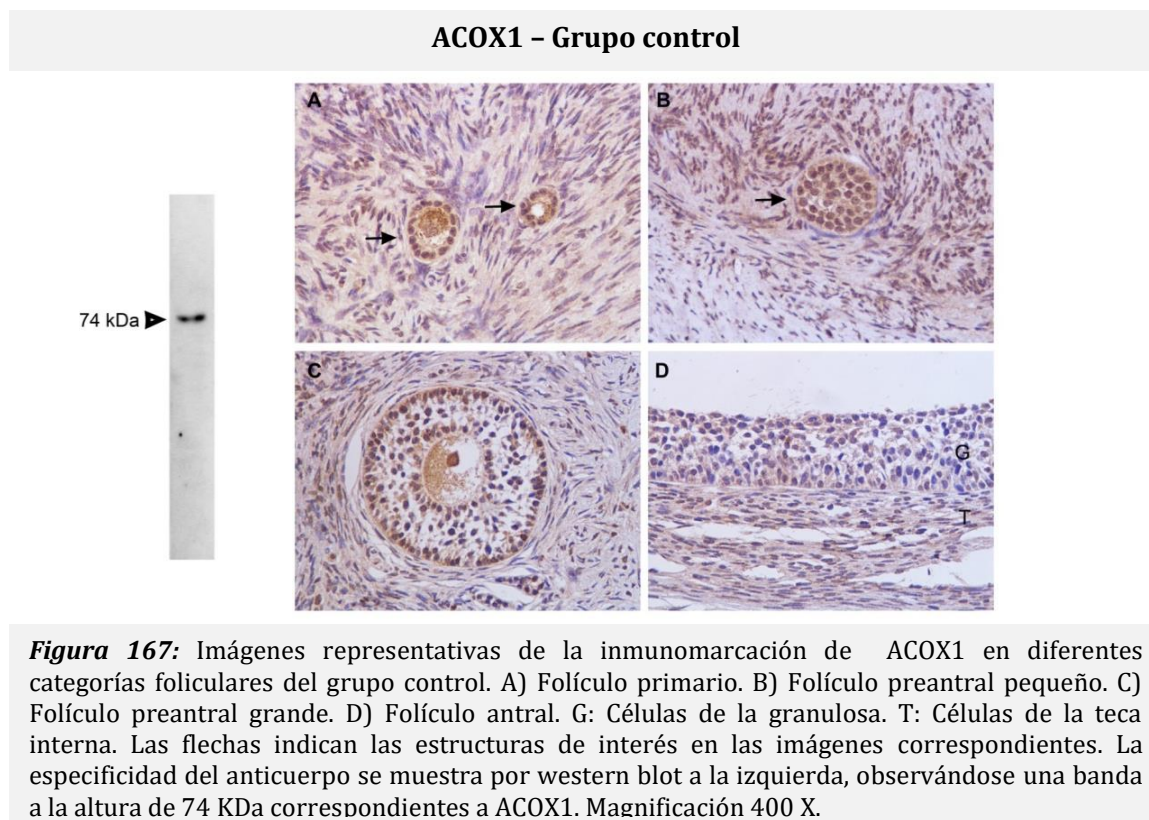


Figura 166: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de ACOX1 en los grupos control y EQO. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) según correspondiera. Los valores representan la media \pm EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).



En el grupo EQO, la expresión de ACOX1 fue similar entre las distintas categorías foliculares durante la foliculogénesis en ambas poblaciones celulares analizadas (granulosa y teca interna) ($p > 0,05$) (Figuras 166 y 168).

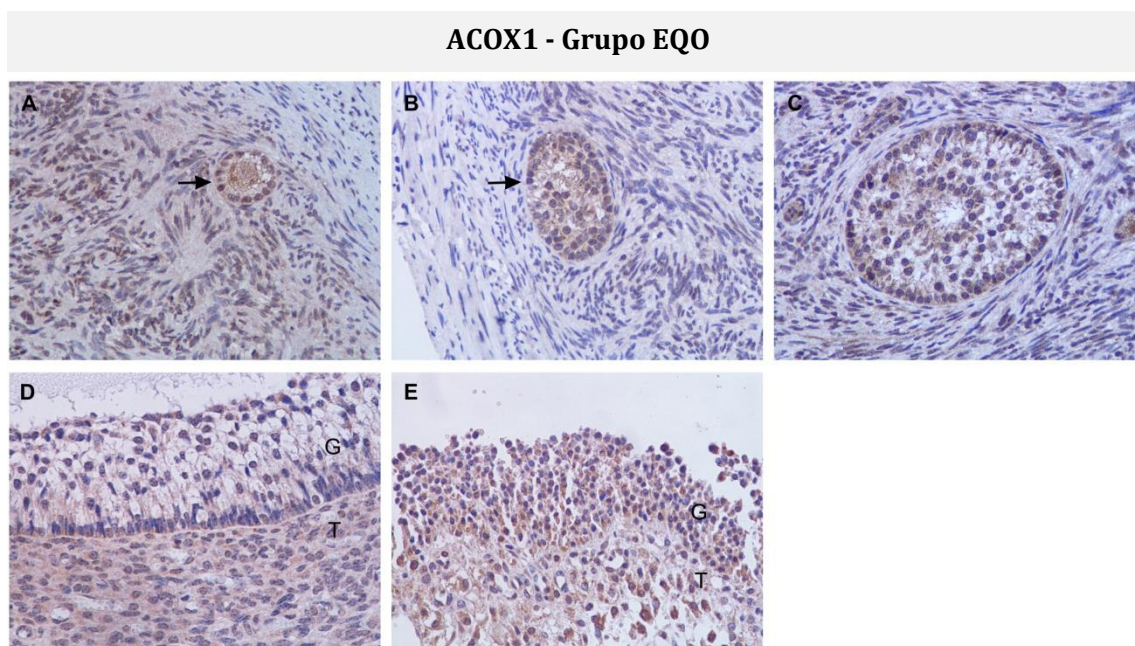


Figura 168: Imágenes representativas de la inmunomarcación de ACOX1 en diferentes categorías foliculares del grupo EQO. A) Folículo primario. B) Folículo preantral pequeño. C) Folículo preantral grande. D) Folículo antral. E) Quiste folicular. G: Células de la granulosa. T: Células de la teca interna. Las flechas indican las estructuras de interés en las imágenes correspondientes. Magnificación 400 X.

5.3.9.2.2. Análisis de comparación de estructuras entre grupos

Los niveles de expresión de ACOX1 fueron similares en las células de la granulosa en todas las categorías foliculares de ambos grupos ($p > 0,05$). En células de la teca la expresión de ACOX1 fue mayor en los quistes respecto a los folículos antrales controles ($p < 0,05$), siendo similar la expresión en las restantes categorías foliculares entre los grupos evaluados ($p > 0,05$) (Figuras 169 y 179).

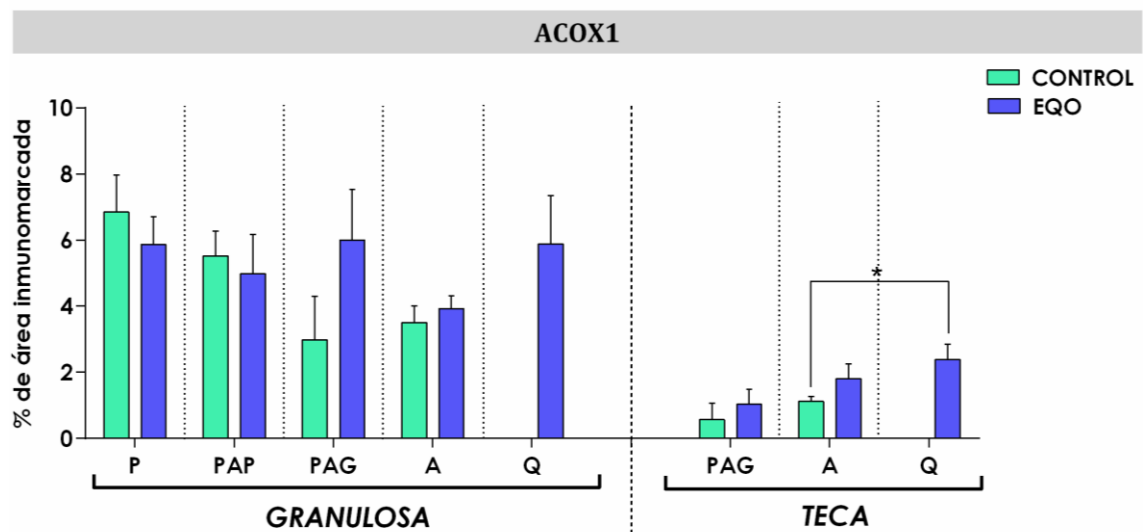


Figura 169: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de ACOX1 en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios (P), preantrales pequeños (PAP), preantrales grandes (PAG), antrales (A) y quistes (Q) de los grupos control y EQO. Los valores representan la media \pm EEM. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los folículos antrales del grupo control y los folículos quísticos ($p < 0,05$).

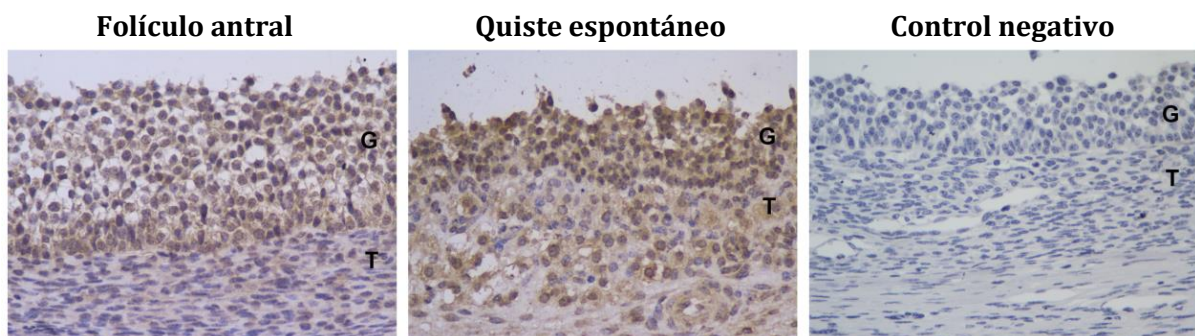


Figura 170: Imágenes representativas de la inmunomarcación de CPT1 en folículos antrales (grupo control) y folículos quísticos (grupo EQO). G: Células de la granulosa. T: Células de la teca. El control negativo de inmunohistoquímica se muestra en la imagen de la derecha. Magnificación 400x.

5.4. CAPÍTULO III:

Discusión

5.4.1. Análisis de metabolitos y β -oxidación en el ovario

La creciente demanda en la producción de leche tiene consecuencias en las tasas de reproducción de las vacas lecheras, con pérdidas económicas importantes. Previamente, hemos demostrado alteraciones en las vías de señalización de la insulina en animales con EQO (Hein y col., 2015). Dichas vías poseen efectos importantes sobre las funciones reproductivas y están reguladas por diversas moléculas, que incluyen determinados metabolitos (glucosa, ácidos grasos, entre otros) y hormonas (adiponectina, grelina, entre otras), que actúan a través de sensores de energía (AMPK, PPAR, etc.) (Dupont y col., 2008a; Buechler y col., 2010; Dupont y Scaramuzzi, 2016). En el presente estudio, a pesar de los valores plasmáticos similares en la mayoría de los metabolitos analizados, en el líquido folicular de los animales con EQO detectamos concentraciones menores de glucosa y triglicéridos junto con concentraciones mayores de AGNE, colesterol y BHB.

La glucosa desempeña un papel esencial en el metabolismo ovárico, siendo su principal fuente de energía (Rabiee y col., 1997,1999; Leroy y col., 2004a). Es probable que la principal fuente de glucosa en el líquido folicular sea la sangre, por lo que la menor concentración de glucosa encontrada en los folículos quísticos en comparación con los controles y la menor concentración en líquido folicular relacionada con el plasma en vacas con EQO posiblemente se deba a una mayor glucólisis anaeróbica en los folículos quísticos (Leese y Lenton, 1990; Leroy y col., 2004a). Además, dado que los triglicéridos en forma de VLDL no atraviesan la pared folicular (Shalgi y col., 1973; Leroy y col., 2004a), los niveles más altos de AGNE detectados en el líquido folicular de los folículos quísticos podrían ser consecuencia de la hidrólisis de los triglicéridos, cuya disponibilidad favorecería su oxidación para obtener energía. Por otra parte, en los folículos quísticos, se detectó una mayor expresión proteica de CPT1 y ACOX1, dos enzimas claves implicadas en la beta-oxidación mitocondrial y peroxisomal, respectivamente. En este sentido, Sánchez-Lazo y col. (2014) han demostrado la importancia de la oxidación y síntesis de ácidos grasos en las células de la granulosa de las vacas para mantener el crecimiento folicular. Por otra parte, determinaron que al utilizar inhibidores de la oxidación de ácidos grasos, disminuye la tasa de maduración de ovocitos *in vitro* y se afecta la viabilidad (Sanchez-Lazo y col., 2014). Además, en las

células del cúmulus oophorus se inhiben genes implicados en la lipogénesis y se estimulan aquellos relacionados con la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos, determinando que el metabolismo de los ácidos grasos en estas células es determinante para mantener la homeostasis metabólica, pudiendo afectar a la progresión de la meiosis y supervivencia de ovocitos. Sumado a esto, (Paczkowski y col., 2013) comprobaron la importancia de la oxidación de ácidos grasos en la maduración ovocitaria en bovinos y porcinos. Por otro lado, el aumento de la oxidación de los ácidos grasos proporcionaría una mayor disponibilidad de acetil-CoA que podría estar relacionada con el incremento de las concentraciones de BHB y colesterol en el líquido folicular de los quistes (Andersen y Dietschy, 1978). Además, la concentración sistémica de colesterol podría contribuir a su aumento en el líquido folicular de los quistes. Se ha demostrado que las células foliculares obtienen colesterol por síntesis *de novo* a partir de acetil-CoA, y de lipoproteínas circulantes que logran pasar la barrera hemato-folicular (Grummer y Carroll, 1988; van Montfoort y col., 2014).

Estudios previos han demostrado los efectos nocivos de los AGNE en la funcionalidad ovárica, como la inhibición de la supervivencia y proliferación de células de la granulosa bovinas, la esteroidogénesis y el desarrollo folicular, y la alteración en el desarrollo de ovocitos (Vanholder y col., 2005b; Van Hoeck y col., 2011; Leroy y col., 2012). Por lo tanto, los niveles más altos de AGNE registrados en el líquido folicular de quistes podrían alterar la funcionalidad normal de las células y, en consecuencia, la esteroidogénesis. Se ha reportado que el aumento de las concentraciones de AGNE puede tener un efecto tóxico directo a nivel ovárico (Kruip y Kemp, 1999). La capa de células de la granulosa es un compartimento avascular rodeado de líquido folicular y de la membrana basal, mientras que la capa de células de teca interna es rica en capilares sanguíneos. En acuerdo con lo observado por Leroy y col. (2004), en la presente tesis determinamos que las concentraciones de AGNE fueron menores en el líquido folicular de los folículos preovulatorios del grupo control que en el plasma del mismo grupo, indicando que las células de la granulosa suelen estar expuestas a concentraciones más bajas de AGNE que las células de teca. Sin embargo, el metabolismo de los AGNE es diferente en ambos compartimentos, ya que las células de granulosa tienen una sensibilidad mayor a los AGNE que las células de la teca (Vanholder y col., 2005b). Los AGNE, especialmente los ácidos grasos saturados de cadena larga, parecen afectar adversamente la fisiología reproductiva. Cuando las células de la granulosa y la teca se

incuban con altas concentraciones de AGNE, su viabilidad y capacidad esteroidogénica se ven obstaculizadas (Vanholder y col., 2005b). En este sentido, hemos detectado alteraciones en la expresión de enzimas esteroidogénicas (Capítulo 1) y en las concentraciones de hormonas esteroideas (Amweg y col., 2013) en suero y líquido folicular de vacas con EQO, lo que podría estar relacionado con concentraciones de AGNE alteradas, como se informó en los resultados del presente capítulo. Resultados adicionales obtenidos refuerzan estas inferencias, en los cuales la menor concentración de progesterona detectada en vacas con EQO está de acuerdo con el estudio *in vitro* reportado por Vanholder y col. (2005a) y podría modular negativamente la funcionalidad ovárica.

5.4.2. Señalización de adiponectina y su implicancia en la EQO

Las adipoquinas están involucradas en diversas funciones como ser la diferenciación de adipocitos, la regulación del metabolismo energético y la sensibilidad a insulina, la regulación de la inflamación y el sistema inmunitario, entre otras (Dupont y col., 2014a; Reverchon y col., 2014). Además, algunas adipoquinas, como la leptina y la adiponectina, pueden regular las funciones de las gónadas y del eje hipotalámico-hipofisario.

La adiponectina y sus receptores (AdipoR1 y AdipoR2) se expresan en diversas células del tracto reproductivo femenino, lo que sugiere que cumplen un rol en la fisiología reproductiva. Además, las funciones reproductivas se encuentran estrechamente asociadas al balance energético y, por lo tanto, los desequilibrios metabólicos pueden conducir al desarrollo de trastornos a nivel ováricos (Reverchon y col., 2014).

Aunque diversos estudios han informado concentraciones más bajas de adiponectina en mujeres con síndrome de ovario poliquístico, principalmente asociadas con la obesidad (Panidis y col., 2003; Kadowaki y Yamauchi, 2005; Lagaly col., 2008;; Toulis y col., 2009), en vacas con EQO, no se observaron similitudes. En este estudio hemos detectado que las vacas con EQO tenían concentraciones más altas de adiponectina que las del grupo control. Además, en un estudio retrospectivo llevado a cabo por nuestro grupo, observamos que la condición corporal en el período de espera

voluntaria no influyó en la incidencia de quistes (Cattaneo y col., 2014). El análisis de los valores de CC registrados en esta tesis, no evidenciaron diferencias entre ambos grupos (control y EQO) y sólo dos de las vacas con EQO presentaron una CC excesiva (4 puntos). Sumado a esto, un estudio reciente (Mansouryar y col., 2018) realizado en vacas Holstein en lactancia temprana, reportó que la condición corporal no tuvo efectos significativos sobre las concentraciones plasmáticas de adiponectina.

Ohtani y col. (2012) midieron la adiponectina sérica en vacas en diferentes etapas de la lactancia y determinaron un aumento en la lactancia posparto, probablemente asociado con el déficit de energía que se produce durante este período. En diversas especies, la acción de la adiponectina se ha estudiado en tejidos como el hígado y el músculo esquelético, y se sabe que esta adipocitoquina está involucrada en la homeostasis y el metabolismo de la glucosa y los lípidos, y participa en el control de las funciones reproductivas (Fruebis, 2001; Yamauchi y col., 2002; Mitchell y col., 2005; Dupont y col., 2012). En el presente estudio, encontramos un aumento en la expresión de AdipoR2 y AMPK en células de teca y granulosa, respectivamente. Probablemente, la mayor unión de la adiponectina a su receptor promueve la utilización de la glucosa y la oxidación a través de la AMPK (Yamauchi y col., 2002), y aumenta el metabolismo de los lípidos en los hepatocitos bovinos cultivados al promover la oxidación de los lípidos (Chen y col., 2013).

La adiponectina, a través de PPARs y AMPK, aumentaría la oxidación de ácidos grasos (Kadowaki y Yamauchi, 2005), lo que coincidiría con nuestros resultados que demostraron una mayor expresión proteica de CPT1 y ACOX1 en vacas con EQO, evidenciando una mayor oxidación de los ácidos grasos. La adiponectina, AMPK y PPAR pueden ser señales claves que regulan la cantidad de energía requerida para el crecimiento de folículos, ovocitos y embriones (Dupont y col., 2008a). Por lo tanto, la activación de estos sensores podría estar relacionada con las bajas concentraciones intraováricas de glucosa y triglicéridos registradas. La adiponectina, en hígado y músculo esquelético, aumentaría la combustión de ácidos grasos por medio de PPAR α , disminuyendo los niveles de triglicéridos en estos tejidos (Yamauchi y col., 2001; Kadowaki y Yamauchi, 2005).

Además, la adiponectina aumenta la sensibilidad a la insulina y, en consecuencia, la insulina estaría regulando negativamente los niveles de ARNm de AdipoR1 y AdipoR2 a través de la activación de PI3K (Kadowaki y Yamauchi, 2005; Ahima y Lazar, 2008).

Sumado a esto, estudios *in vitro* con células de teca bovina han demostrado que la adiponectina disminuye la producción de andrógenos y progesterona inducida por la insulina (Dupont y col., 2012). En los capítulos 1 y 2 describimos las alteraciones en la vía de señalización de insulina encontradas en folículos persistentes y quísticos. Observamos numerosas moléculas claves disminuidas en su expresión proteica, lo que podría actuar como estímulo para el aumento de las concentraciones de adiponectina en sangre, actuando esta como “moduladora” a los niveles de insulina circulantes. En ratones, la adiponectina disminuye la resistencia a la insulina al disminuir el contenido de triglicéridos en músculos e hígado, posiblemente al aumentar la expresión de moléculas involucradas tanto en la combustión de ácidos grasos como en la disipación de energía en el músculo (Yamauchi y col., 2001).

La AMPK es un sensor metabólico del estado de energía celular y además de ser activada por hormonas como la adiponectina, se activa por un aumento en la proporción de AMP:ATP que se asocia con un agotamiento de ATP en respuesta al estrés nutricional y ambiental (Hardie, 2004; Tosca y col., 2006). En células granulosas bovinas estimuladas con dos activadores de AMPK (AICAR y metformina) se observó la inhibición en la secreción de progesterona y estradiol (Tosca y col., 2008), estos efectos estarían asociados con la inhibición de la vía de señalización MAPK/ERK1/2 (Scaramuzzi y col., 2010). Estos antecedentes coincidirían con lo presentado en el capítulo 1, donde encontramos menores concentraciones de progesterona tanto en suero como en líquido folicular de animales con EQO, y además una menor expresión proteica de p-ERK1/2, asociado ampliamente con la esteroidogénesis.

Los resultados del presente capítulo evidencian una alteración local en algunos sensores metabólicos en folículos quísticos, que podrían promover la oxidación de ácidos grasos y glucosa. Sin embargo, a pesar del aumento en la oxidación de AGNE, su mayor concentración en el líquido folicular de los folículos quísticos de las vacas con EQO podría ser perjudicial para las células foliculares, comprometiendo la foliculogénesis ovárica normal, incluida la ovulación. Además, podrían generar un microambiente adverso para la reanudación de la actividad ovárica y serían una causa de la persistencia de los folículos y la recurrencia de la EQO.

6. CONCLUSIONES FINALES

Los problemas de subfertilidad en las vacas lecheras fueron incrementándose con los años, coincidiendo con la intensificación de los tambos, y la selección genética dirigida hacia una mayor producción de leche individual. Las adaptaciones endocrinas y metabólicas, propias de la etapa de lactancia, asociadas con la disminución de la ingesta de alimento en la última etapa de la gestación y el notable aumento de los requerimientos en el posparto, contribuyen a la exacerbación del balance negativo de nutrientes en la lactancia temprana. Los desbalances nutricionales durante el período posparto producen a nivel sistémico, una disminución transitoria en los niveles de glucosa, insulina, IGF1, en la frecuencia de los pulsos de LH, e incrementos de algunos metabolitos como BHB, AGNE y triglicéridos.

Los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen al estado actual del conocimiento de la etiopatogenia de la EQO y los mecanismos involucrados en la persistencia folicular considerando el estado metabólico de los animales. De esta manera, los resultados obtenidos junto a los aportes de otros autores discutidos en este trabajo, nos permitieron arribar a las conclusiones aquí detalladas.

Es esencial entender los mecanismos que preceden al establecimiento de la EQO, ya que esta enfermedad representa una causa importante de subfertilidad en el ganado lechero. En el presente trabajo utilizamos un modelo experimental de persistencia folicular para evaluar los componentes principales de la cascada de señalización de insulina en las etapas previas al desarrollo de la EQO. Este modelo ha sido optimizado previamente por nuestro grupo de trabajo y demostró ser apropiado para estudiar las etapas iniciales del desarrollo de quistes en las vacas lecheras. Por medio de este modelo se demostró que el perfil endocrino, la dinámica de crecimiento y las características histológicas de los folículos ováricos persistentes fueron análogos a los de los quistes espontáneos. Los resultados obtenidos en esta tesis aportan características metabólicas adicionales que sustentan al modelo desarrollado para el estudio de la enfermedad.

Previamente, se ha demostrado que la insulina cumple un rol importante en la esteroidogénesis, la maduración folicular y la función ovárica posparto normal. Además, alteraciones en las concentraciones de insulina pueden afectar la respuesta a la LH en los folículos, pudiendo conducir a la falla ovulatoria y a la formación de quistes. Es por ello que alteraciones en la concentración sistémica e intrafolicular de insulina, junto a la

expresión alterada de los componentes de su vía de señalización, podrían modificar las funciones normales del ovario e impactar en los procesos patológicos como la persistencia folicular y la EQO.

Los resultados logrados evidencian que la EQO y la persistencia folicular, inducida por el tratamiento prolongado con progesterona en vacas lecheras, son concurrentes con la expresión alterada de los componentes críticos de la vía de señalización de insulina. La expresión de la mayoría de los intermediarios evaluados se encontraron disminuidos en los folículos persistentes y en los quistes espontáneos. Si bien se ha demostrado que numerosas moléculas están involucrados en la vía de señalización de la insulina, los intermediarios IR/IRS, PI3K y Akt representan nodos de importancia relevante. El óptimo funcionamiento de las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK dentro del ovario es crítico para el desarrollo folicular y la función ovárica normal. En este trabajo encontramos disminuida la expresión de Akt no sólo en los quistes espontáneos, sino también en los folículos persistentes, indicando una alteración de esta vía desde etapas tempranas. Es decir, que las acciones moduladas por Akt podrían estar comprometidas, como ser la esteroidogénesis y la proliferación celular. Asimismo, la proliferación celular y la síntesis de proteínas podrían verse alteradas además, debido a que mTOR y ERK se encontraron disminuidos en los quistes. La determinación de dichas alteraciones resultan críticas, ya que los efectos asociados como la síntesis de proteínas y la proliferación celular cumplen papeles determinantes para la óptima funcionalidad ovárica.

Como se mencionó previamente, la insulina es capaz de interactuar con la FSH para estimular la producción de progesterona e inhibir la producción de estrógenos. En este trabajo se muestra que, si bien la concentración sistémica e intrafolicular de insulina fue elevada, la mayoría de los componentes estudiados de la vía de señalización se encontraron disminuidos en los folículos persistentes, lo que podría reflejarse por los bajos niveles de progesterona determinados en el líquido folicular. Los hallazgos de este trabajo reflejan una notable alteración de los intermediarios de la vía de señalización de insulina en los estadios previos al desarrollo del quiste. En este sentido, una perturbación en la respuesta a la insulina durante las primeras etapas de persistencia folicular tendría efectos contraproducentes en el metabolismo celular de los folículos, la esteroidogénesis y el proceso de ovulación, conduciendo al desarrollo de la EQO.

La subfertilidad en las vacas lecheras no puede atribuirse a una sola causa, sino que se considera de origen multifactorial. Tal es así que la nutrición influye considerablemente en el desarrollo folicular ovárico en rumiantes, posiblemente a través de cambios en las hormonas metabólicas y también por los efectos directos de nutrientes particulares en el ovario. El desarrollo de la EQO también se puede asociar a aspectos nutricionales, metabólicos y endocrinos. Además de los desequilibrios de ciertas hormonas, como la insulina, la adiponectina y la leptina, se ha propuesto que diversos metabolitos, como la glucosa, los AGNE y los aminoácidos, participarían en la formación de quistes. En este trabajo de tesis hemos registrado una menor concentración intrafolicular de glucosa y triglicéridos y un aumento de AGNE en quistes, lo que indicaría un mayor gasto energético (por glucólisis anaeróbica o hidrólisis de los triglicéridos, respectivamente). Sumado a ello, en los quistes se detectó una mayor expresión proteica de CPT1 y ACOX1, dos enzimas claves implicadas en la beta-oxidación de los ácidos grasos. La oxidación y síntesis de ácidos grasos en las células foliculares es altamente relevante para el crecimiento folicular, la maduración y la viabilidad de los ovocitos. El aumento de la oxidación de los ácidos grasos podría promover la biodisponibilidad de acetil-CoA, conduciendo a un incremento de las concentraciones de beta-hidroxibutirato y colesterol en el líquido folicular de los quistes. Además, la concentración sistémica de colesterol podría contribuir a su aumento en el líquido folicular de los quistes. Al respecto, se ha demostrado que las células foliculares obtienen colesterol por síntesis *de novo* a partir de acetil-CoA, y de lipoproteínas circulantes que logran pasar la barrera hemato-folicular.

Diversos estudios demostraron los efectos nocivos de los AGNE sobre la proliferación de células de la granulosa bovinas, la esteroidogénesis y el desarrollo folicular, y la alteración en el desarrollo de ovocitos. Por lo tanto, los mayores niveles de AGNE registrados en el líquido folicular de quistes, podrían alterar la funcionalidad normal de las células y en consecuencia la esteroidogénesis. En este sentido, hemos registrado alteraciones en la expresión de enzimas esteroidogénicas como la CYP19A1 y la 3 β -HSD y en las concentraciones de hormonas esteroideas en suero y líquido folicular de vacas con EQO, lo que podría estar relacionado con las concentraciones alteradas de AGNE.

Por otro lado, las adipoquinas están involucradas en diversas funciones como por ejemplo, la regulación del metabolismo energético y la sensibilidad a la insulina.

Además, ciertas adipoquinas, como la leptina y la adiponectina, pueden regular funciones reproductivas a nivel de las gónadas y del eje hipotalámico-hipofisario. Las funciones reproductivas se encuentran estrechamente asociadas al balance energético y, por lo tanto, los desequilibrios metabólicos pueden conducir al desarrollo de trastornos a nivel ovárico. En este estudio, determinamos un aumento en la expresión de AdipoR2 y AMPK en los quistes. Probablemente, la mayor unión de la adiponectina a su receptor promueve la utilización de la glucosa y la oxidación vía AMPK. La AMPK es un sensor metabólico del estado de energía celular, que se activa en respuesta al estrés metabólico y la demanda energética. La adiponectina, a través de AMPK, aumentaría la oxidación de ácidos grasos, lo que coincidiría con nuestros resultados que demostraron una mayor expresión proteica de CPT1 y ACOX1 en vacas con EQO, evidenciando una mayor oxidación de los ácidos grasos. Por lo tanto, la activación de estos sensores podría estar relacionada con las bajas concentraciones intraováricas de glucosa y triglicéridos registradas.

Otra de las funciones bien conocidas de la adiponectina es que aumenta la sensibilidad a la insulina. En los capítulos 1 y 2 describimos las alteraciones de la vía de señalización de insulina en quistes y folículos persistentes. Se determinó una disminución en la expresión de moléculas claves de la cascada, como IR, IRS1, PI3K y Akt, que podrían promover el aumento de las concentraciones de adiponectina en sangre, actuando ésta como moduladora de los niveles de insulina circulantes. En células de la granulosa bovinas, la adiponectina es capaz de inhibir la secreción de progesterona y estradiol; estos efectos estarían asociados con la inhibición de la vía de señalización MAPK/ERK1/2. Este mecanismo, sumado a la menor expresión proteica de ERK1/2, podría estar respondiendo a las menores concentraciones de progesterona detectadas en animales con EQO. Las determinaciones y alteraciones presentadas demuestran la complejidad de las interacciones entre el metabolismo y la reproducción en las cuales participan activamente los intermediarios de señalización y sensores nutricionales mencionados.

Este trabajo contribuye con valiosa información sobre la influencia del metabolismo y la cascada de señalización de la insulina sobre la etiopatogenia de la enfermedad quística ovárica en las vacas, en etapas previas al desarrollo de la enfermedad y una vez establecida la misma.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aardema H, Vos PLAM, Gadella BM. 2018. Cumulus cells protect the oocyte against saturated free fatty acids. *Anim Reprod.* 15: 737–750.
- Abd Ellah MR, Hussein HA, Derar DR. 2010. Ovarian follicular fluid constituents in relation to stage of estrus cycle and size of the follicle in buffalo. *Vet World.* 3: 263–267.
- Acosta TJ, Tetsuka M, Matsui M, Shimizu T, Berisha B, Schams D, Miyamoto A. 2005. In vivo evidence that local cortisol production increases in the preovulatory follicle of the cow. *J Reprod Dev.* 51: 483–489.
- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* 94: 177–188.
- Aerts JMJ, Bols PEJ. 2010a. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod Domest Anim.* 45: 171-179.
- Aerts JMJ, Bols PEJ. 2010b. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Development. Reprod Domest Anim.* 45: 180-187.
- Ahima RS, Lazar MA. 2008. Adipokines and the Peripheral and Neural Control of Energy Balance. *Mol Endocrinol.* 22: 1023–1031.
- Albomohsen H, Mamouei M, Tabatabaei S, Fayazi J. 2011. Metabolite Composition Variations of Follicular Fluid and Blood Serum in Iranian Dromedary Camels During the Peak Breeding Season. *J Anim Vet Adv.* 10: 327–331.
- Alfaro NS, Salvetti NR, Velazquez MM, Stangaferro ML, Rey F, Ortega HH. 2012. Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Res Vet Sci.* 92: 478–485.
- Amweg AN, Paredes A, Salvetti NR, Lara HE, Ortega HH. 2011. Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroid secretion in the bovine ovary. *Theriogenology.* 75: 628–637.
- Amweg AN, Salvetti NR, Stangaferro ML, Paredes AH, Lara HH, Rodríguez FM, Ortega HH. 2013. Ovarian localization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD):

- Effects of ACTH stimulation and its relationship with bovine cystic ovarian disease. *Domest Anim Endocrinol.* 45: 126–140.
- Amweg AN, Rodríguez FM, Huber E, Marelli BE, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. 2016. Role of glucocorticoids in cystic ovarian disease: Expression of glucocorticoid receptor in the bovine ovary. *Cells Tissues Organs.* 201: 138–147.
- Andersen JM, Dietschy JM. 1978. Relative Importance of High and Low Density Lipoproteins Regulation of Cholesterol Synthesis in the Adrenal Gland Ovary and Testis of the Rat. *J Biol Chem.* 253: 9024–9032.
- Ando M, Kol S, Kokia E, Ruutiainen-Altman K, Sirois J, Rohan RM, Payne DW, Adashi, E. Y. 1998. Rat Ovarian Prostaglandin Endoperoxide Synthase-1 and -2: Periovulatory Expression of Granulosa Cell-Based Interleukin-1-Dependent Enzymes. *Endocrinology.* 139: 2501–2508.
- Andric N, Thomas M, Ascoli, M. 2010. Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor Is Involved in the Lutropin Receptor-Mediated Down-Regulation of Ovarian Aromatase Expression in Vivo. *Mol Endocrinol.* 24: 552–560.
- Arias P, Rodríguez M, Szwarcfarb B, Sinay IR, Moguilevsky JA. 1992. Effect of Insulin on LHRH Release by Perifused Hypothalamic Fragments. *Neuroendocrinology.* 56: 415–418.
- Armstrong DG, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. 2002. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction.* 123: 371–378.
- Aroda V, Ciaraldi TP, Chang SA, Dahan MH, Chang RJ, Henry RR. 2008. Circulating and cellular adiponectin in polycystic ovary syndrome: relationship to glucose tolerance and insulin action. *Fertil Steril.* 89: 1200–1208.
- Baba T, Endo T, Sata F, Honnma H, Kitajima Y, Hayashi T, Manase K, Kanaya M, Yamada H, Minakami H, Kishi R, Saito, T. 2007. Polycystic ovary syndrome is associated with genetic polymorphism in the insulin signaling gene IRS-1 but not ENPP1 in a Japanese population. *Life Sci.* 81: 850–854.
- Bagavandoss P, Midgley AR, Wicha M. 1983. Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J*

- Histochem Cytochem. 31: 633–640.
- Bao B, Allen Garverick H, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. 1997. Expression of Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Encoding 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase $\Delta 4,\Delta 5$ Isomerase (3β -HSD) during Recruitment and Selection of Bovine Ovarian Follicles: Identification of Dominant Follicles by Expression of 3β -HSD mRNA within the . Biol Reprod. 56: 1466–1473.
- Bao B, Garverick HA. 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. J Anim Sci. 76: 1903–1921.
- Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Lorente JA, Ortega HH. 2007. The role of ACTH in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome in rats: hormonal profiles and ovarian morphology. Physiol Res. 56: 67–78.
- Bartlett PC, Ngategize PK, Kaneene JB, Kirk JH, Anderson SM, Mather EC. 1986. Cystic follicular disease in Michigan Holstein-Friesian cattle: Incidence, descriptive epidemiology and economic impact. Prev Vet Med. 4: 15–33.
- Bartolome JA, Melendez P, Kelbert D, Swift K, McHale J, Hernandez J, Silvestre F, Risco CA, Arteché ACM, Thatcher WW, Archbald LF. 2005. Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. Theriogenology. 63: 1026–1037.
- Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 2001. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. Biol Reprod. 64: 432–441.
- Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. 2009. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. Endocr Rev. 30: 586–623.
- Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. 2006. Optimizing Ovulation to First GnRH Improved Outcomes to Each Hormonal Injection of Ovsynch in Lactating Dairy Cows. J Dairy Sci. 89: 3413–3424.
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. 2001. The adipocyte-secreted

- protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med.* 7: 947–953.
- Bergman EN. 1976. Glucose metabolism in ruminants. Glucose metabolism in ruminants. In *Proceedings Third International Conference on Production Disease in Farm Animals*. Wageningen. 25-29.
- Berry DP, Wall E, Pryce JE. 2014. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *Animal.* 8: 105–121.
- Bierschwal CJ. 1966. A clinical study of cystic conditions of the bovine ovary. *J Am Vet Med Assoc.* 149: 1591–1595.
- Bilodeau-Goeseels S. 2006. Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. *Theriogenology.* 66: 297–306.
- Bigelow KL, Fortune JE. 1998. Characteristics of prolonged dominant versus control follicles: follicle cell numbers, steroidogenic capabilities, and messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes. *Biol Reprod.* 58: 1241–1249.
- Blanco A. 2006. *Química Biológica*. Editorial El Ateneo.
- Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG. 1994. Characterization of follicular energy metabolism. *Hum Reprod.* 9: 604–609.
- Bossaert P, Leroy JLMR, De Vliegher S, Opsomer G. 2008. Interrelations Between Glucose-Induced Insulin Response, Metabolic Indicators, and Time of First Ovulation in High-Yielding Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 91: 3363–3371.
- Bossaert P, De Cock H, Leroy JLMR, De Campeneere S, Bols PEJ, Filliers M, Opsomer G. 2010. Immunohistochemical visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected in vivo. *Theriogenology.* 73: 1210–1219.
- Bosu WTK, Peter AT. 1987. Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 28: 725–736.
- Braw-Tal R, Yossefi S. 1997. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil.* 109: 165–171.
- Braw-Tal R, Roth Z. 2005. Gene expression for LH receptor, 17 α -hydroxylase and StAR in

- the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction*. 129: 453–461.
- Braw-Tal R, Pen S, Roth Z. 2009. Ovarian cysts in high-yielding dairy cows. *Theriogenology*. 72: 690–698.
- Bridges PJ, Fortune JE. 2003. Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Domest Anim Endocrinol*. 25: 199–214.
- Brockman RP, Laarveld B. 1986. Hormonal regulation of metabolism in ruminants; a review. *Livest Prod Sci*. 14: 313–334.
- Brown C, LaRocca J, Pietruska J, Ota M, Anderson L, Duncan Smith S, Weston P, Rasoulpour T, Hixon ML. 2010. Subfertility Caused by Altered Follicular Development and Oocyte Growth in Female Mice Lacking PKBalpha/Akt11. *Biol Reprod*. 82: 246–256.
- Brown EM, Elmore RG, Garverick HA, Kesler DJ. 1982. Gonadotropin releasing hormone treatment of dairy cows with ovarian cysts. *Theriogenology*. 17: 689–696.
- Bucholtz DC, Chiesa A, Pappano WN, Nagatani S, Tsukamura H, Maeda KI, Foster DL. 2000. Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin in the diabetic male lamb. *Biol Reprod*. 62: 1248–1255.
- Budak E, Fernández Sánchez M, Bellver J, Cerveró A, Simón C, Pellicer A. 2006. Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil Steril*. 85: 1563–1581.
- Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. 2010. Adiponectin receptor binding proteins - recent advances in elucidating adiponectin signalling pathways. *FEBS Lett*. 584: 4280–4286.
- Burks DJ, de Mora JF, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. 2000. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature*. 407: 377–382.
- Butler WR. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*. 60-61: 449–457.
- Butler WR. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in post partum dairy cows. *Livest Prod Sci*. 83: 211–218.

- Butler WR. 2005. Inhibition of ovulation in the postpartum cow and the lactating sow. *Livest Prod Sci.* 98: 5–12.
- Calder MD, Salfen BE, Bao B, Youngquist RS, Garverick HA. 1999. Administration of progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and initiates ovulatory follicular growth. *J Anim Sci.* 77: 3037–3042.
- Calder MD, Manikkam M, Salfen BE, Youngquist RS, Lubahn DB, Lamberson WR, Garverick HA. 2001. Dominant Bovine Ovarian Follicular Cysts Express Increased Levels of Messenger RNAs for Luteinizing Hormone Receptor and 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase $\Delta 4, \Delta 5$ Isomerase Compared to Normal Dominant Follicles. *Biol Reprod.* 65: 471–476.
- Camp T, Rahal J, Mayo K. 1991. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol.* 5: 1405–1417.
- Campos DB, Palin M, Bordignon V, Murphy BD. 2008. The “ beneficial ” adipokines in reproduction and fertility. *Int J Obes.* 32: 223–231.
- Canty MJ, Boland MP, Evans ACO, Crowe MA. 2006. Alterations in follicular IGFBP mRNA expression and follicular fluid IGFBP concentrations during the first follicle wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci.* 93: 199–217.
- Carletti MZ, Christenson LK. 2009. Rapid effects of LH on gene expression in the mural granulosa cells of mouse periovulatory follicles. *Reproduction.* 137: 843–855.
- Carrière PD, Harvey D, Cooke GM. 1996. The role of pregnenolone-metabolizing enzymes in the regulation of oestradiol biosynthesis during development of the first wave dominant follicle in the cow. *J Endocrinol.* 149: 233–242.
- Cattaneo L, Signorini M, Bertoli J, Bartolomé JA, Gareis NC, Díaz PU, Bó GA, Ortega, HH. 2014. Epidemiological Description of Cystic Ovarian Disease in Argentine Dairy Herds: Risk Factors and Effects on the Reproductive Performance of Lactating Cows. *Reprod Domest Anim.* 49: 1028–1033.
- Cecconi S, Mauro A, Cellini V, Patacchiola F. 2012. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *Int J Dev Biol.* 56: 809–817.

- Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. 2007. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction*. 133: 719–731.
- Chang SC, Jones JD, Ellefson RD, Ryan RJ. 1976. The porcine ovarian follicle: I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. *Biol Reprod*. 15: 321–328.
- Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol*. 14: 4902–4911.
- Chen YJ, Hsiao PW, Lee MT, Mason JI, Ke FC, Hwang JJ. 2007. Interplay of P13K and cAMP/PKA signaling, and rapamycin-hypersensitivity in TGF β 1 enhancement of FSH-stimulated steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells. *J Endocrinol*. 192: 405–419.
- Chen H, Zhang L, Li X, Li X, Sun G, Yuan X, Leia L, Liua J, Yina L, Denga Q, Wanga J, Liua Z, Yanga W, Wanga Z, Zhang H, Liu G. 2013. Adiponectin activates the AMPK signaling pathway to regulate lipid metabolism in bovine hepatocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 138: 445–454.
- Cheng Y, Kim J, Li XX, Hsueh AJ. 2015. Promotion of ovarian follicle growth following mTOR activation: Synergistic effects of AKT stimulators. *PLoS ONE*. 10(2), 1–9.
- Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. 2001. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest*. 108: 1875–1881.
- Comim FV, Hardy K, Franks S. 2013. Adiponectin and its receptors in the ovary: Further evidence for a link between obesity and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *PLoS ONE*. 8: 1–9.
- Comim FV, Gutierrez K, Bridi A, Bochi G, Chemeris R, Rigo ML, Dau AMP, Cezar AS, Moresco RN, Gonçalves PBD. 2016. Effects of adiponectin including reduction of androstenedione secretion and ovarian oxidative stress parameters in vivo. *PLoS ONE*. 11: 1–11.

- Conley AJ, Bird I. 1997. The Role of Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Integration of Gonadal and Adrenal Steroidogenesis via the A5 and A4 Pathways of Steroidogenesis in Mammals. *Biol Reprod.* 56: 789–799.
- Cook DL, Smith CA, Parfet JR, Youngquist RS, Brown EM, Garverick HA. 1990. Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cattle. *Reproduction.* 90: 37–46.
- Cui Y, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist UK, Gonzalez FJ, Flaws J, Wagner KU, Hennighausen, L. (2002). Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPAR γ) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J Biol Chem.* 277: 17830–17835.
- da Rosa P, Dau A, De Cesaro MP, Dos Santos JT, Gasperin BG, Duggavathi, R., Bordignon V, Gonçalves P. 2016. Mechanistic target of rapamycin is activated in bovine granulosa cells after LH surge but is not essential for ovulation. *Reprod Domest Anim.* 51: 766–773.
- Davoren JB, Kasson BG, Li CH, Hsueh AJ. 1986. Specific insulin-like growth factor (IGF) I- and II-binding sites on rat granulosa cells: relation to IGF action. *Endocrinology.* 119: 2155–2162.
- De Rensis F, Peters AR. 2002. The Control of Follicular Dynamics by PGF2 α , GnRH, hCG and Oestrus Synchronization in Cattle. *Reprod Domest Anim.* 34: 49–59.
- De Silva M, Reeves JJ. 1988. Hypothalamic-pituitary function in chronically cystic and regularly cycling dairy cows. *Biol Reprod.* 38: 264–269.
- Dellmann HD. 1994. *Histología veterinaria*. Editorial Acribia.
- Díaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia WJ, Matiller V, Salvetti NR, Rey F, Barberis F, Cattaneo L, Ortega HH. 2015. Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: An experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology.* 84: 1149–1160.
- Díaz PU, Hein GJ, Belotti EM, Rodríguez FM, Rey F, Amweg AN, Matiller V, Baravalle ME, Ortega HH, Salvetti NR. 2016. BMP2, 4 and 6 and BMPR1B are altered from early stages of bovine cystic ovarian disease development. *Reproduction.* 152: 333–350.
- Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. 2003. Effects of nutrition and metabolic

- status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci.* 78: 345–370.
- Downing JA, Scaramuzzi RJ. 1997. The effect of the infusion of insulin during the luteal phase of the estrous cycle on the ovulation rate and on plasma concentrations of LH, FSH and glucose in ewes. *Theriogenology.* 47: 747–759.
- Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. 1999. The effect of a direct arterial infusion of insulin and glucose on the ovarian secretion rates of androstenedione and oestradiol in ewes with an autotransplanted ovary. *J Endocrinol.* 163: 531–541.
- Downs SM, Mosey JL, Klinger J. 2009. Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 76: 844–853.
- Drackley JK. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J Dairy Sci.* 82: 2259–2273.
- Duarte A, Castillo AF, Podestá EJ, Poderoso C. 2014. Mitochondrial fusion and ERK activity regulate steroidogenic acute regulatory protein localization in mitochondria. *PLoS ONE.* 9: 1–12.
- Dunaif A. 1997. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: Mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* 18: 774–800.
- Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. 2010. Beta-Oxidation Is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development¹. *Biol Reprod.* 83: 909–918.
- Dunning KR, Russell DL, Robker RL. 2014. Lipids and oocyte developmental competence: The role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction.* 148: 15–27
- Dupont J, Chabrolle C, Ramé C, Tosca L, Coyral-Castel S. 2008a. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors, adenosine monophosphate-activated kinase, and adiponectin in the ovary. *PPAR Res.* 2008: 1–9.
- Dupont J, Froment P, Ramé C, Pierre P, Coyral-Castel S, Chabrolle C. 2008b. Rôle des acides gras sur les fonctions ovariennes : implications des Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) et des adipocytokines. *Gynecol Obstet Fertil.* 36: 1230–1238.
- Dupont J, Reverchon M, Cloix L, Froment P, Ramé C. 2012. Involvement of adipokines,

- AMPK, PI3K and the PPAR signaling pathways in ovarian follicle development and cancer. *Int J Dev Biol.* 56: 959–967.
- Dupont J, Reverchon M, Bertoldo MJ, Froment P. 2014a. Nutritional signals and reproduction. *Mol Cell Endocrinol.* 382: 527–537.
- Dupont J, Scaramuzzi RJ, Reverchon M. 2014b. The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *Animal.* 8: 1–14.
- Dupont J, Scaramuzzi RJ. 2016. Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. *Bioch J.* 473: 1483–1501.
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. 1989. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 72: 68–78.
- Edwards RG. 1974. Follicular fluid. *J Reprod Fertil.* 37: 189–219.
- Enciclopedia Británica. 2007. 15ª Edición. Editorial Enciclopedia Británica.
- Engelhardt W, Breves G. 2005. *Fisiología Veterinaria*. Editorial Acribia.
- Erb RE, Monk EL, Callahan CJ, Mollett TA. 1973. Endocrinology of induced ovarian follicular cysts. *J Anim Sci.* 37: 310–310.
- Escobar-Morreale HF. 2006. Adiponectin and resistin in PCOS: a clinical, biochemical and molecular genetic study. *Hum Reprod.* 21: 2257–2265.
- Espey LL. 1980. Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. *Biol Reprod.* 22: 73–106.
- Evans ACO, Fortune JE. 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology.* 138: 2963–2971.
- Evans ACO, Martin F. 2000. Kinase pathways in dominant and subordinate ovarian follicles during the first wave of follicular development in sheep. *Anim Reprod Sci.* 64: 221–231.
- Eyestone WH, Ax RL. 1984. A review of ovarian follicular cysts in cows, with comparisons to the condition in women, rats and rabbits. *Theriogenology.* 22: 109–125.

- Fan CY, Pan J, Chu R, Lee D, Kluckman KD, Usuda N, Singh I, Yeldandi AV, Rao MS, Maeda N, Reddy JK. 1996. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem.* 271: 24698–24710.
- Fan HY, Liu Z, Cahill N, Richards JS. 2008. Targeted Disruption of Pten in Ovarian Granulosa Cells Enhances Ovulation and Extends the Life Span of Luteal Cells. *Mol Endocrinol.* 22: 2128–2140.
- Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS. 2009. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science.* 324: 938–941.
- Fathalla MA, Geissinger HD, Liptrap RM. 1978. Effect of endometrial damage and prostaglandin F 2 alpha on experimental cystic ovarian follicles in the cow. *Res Vet Sci.* 25: 269–279.
- Ferguson EM, Leese HJ. 2006a. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev.* 73: 1195–1201.
- Field SL. 2014. Cytokines in Ovarian Folliculogenesis, Oocyte Maturation and Luteinisation. *Mol Reprod Dev.* 81: 284–314.
- Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. 2002. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor- β superfamily. *Mol Cell Endocrinol.* 191: 35–43.
- Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. 2011. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 124: 163–169.
- Fortune JE. 1986. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod.* 35: 292–299.
- Fortune JE, Quirk SM. 1988. Regulation of Steroidogenesis in Bovine Preovulatory Follicles. *J Anim Sci.* 66: 1–8.
- Fortune JE. 1994. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. *Biol Reprod.* 50: 225–232.
- Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, Turzillo AM. 2001. Differentiation of Dominant

- Versus Subordinate Follicles in Cattle. *Biol Reprod.* 65(3): 648–654.
- Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. 2004. Follicular development: The role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci.* 82–83: 109–126.
- Frandsen RD, Wilke W. 2009. *Anatomy and physiology of farm animals*. Editorial John Wiley & Sons.
- Fruebis J. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 98: 2005–2010.
- Fukuda S, Orisaka M, Tajima K, Hattori K, Kotsuji F. 2009. Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells. *J Ovarian Res.* 2: 1–8.
- Gareis NC, Huber E, Hein GJ, Rodríguez FM, Salvetti NR, Angeli E, Ortega HH, Rey F. 2018a. Impaired insulin signaling pathways affect ovarian steroidogenesis in cows with COD. *Anim Reprod Sci.* 192: 298–312.
- Garnero O, Perusia O. 2002. Círugía de cabeza, cuello y torax. Aparato reproductor de la hembra. En: Garnero O, Perusia O, *Manual de anestesiología y cirugías del bovino*. 3ra edición. Editorial Imprenta San Cayetano, Santa Fe. 31: 59-76
- Garnsworthy PC, Sinclair KD, Webb R. 2008. Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. *Animal.* 2: 1144–1152.
- Garverick HA. 1997. Ovarian Follicular Cysts in Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 80: 995–1004.
- Geneser F. 2005. *Histología*. 3ra edición. Editorial Médica Panamericana. 813.
- Gérard N, Loiseau S, Duchamp G, Seguin F. 2002. Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR). *Reproduction.* 124: 241–248.
- Ginther OJ. 2000a. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci.* 60–61: 61–79.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 2000b. Selection of the Dominant Follicle in Cattle: Role of Two-Way Functional Coupling Between Follicle-Stimulating

- Hormone and the Follicles. *Biol Reprod.* 62: 920–927.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K. 2002. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reproduction.* 124: 475–482.
- Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci.* 78: 239–257.
- Godsland IF. 2010. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. *Clin Sci.* 118: 315–332.
- Gong JG. 2002. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: Practical implications. *Dom Anim Endocrinol.* 23: 229–241.
- Gosden RG, Hunter RHF, Telfer E, Torrance C, Brown N. 1988. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J Reprod Fertil.* 82: 813–825.
- Goto M, Iwase A, Ando H, Kurotsuchi S, Harata T, Kikkawa F. 2007. PTEN and Akt expression during growth of human ovarian follicles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* *J Assist Reprod Genet.* 24: 541–546.
- Gougeon A, Lefèvre B. 1983. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *J Reprod Fertil.* 69: 497–502.
- Grover N. 2006. Principles of biochemistry. 4th edition.
- Grummer RR, Carroll DJ. 1988. A Review of Lipoprotein Cholesterol Metabolism: Importance to Ovarian Function. *J Anim Sci.* 66: 3160–3173.
- Grum DE, Hansen LR, Drackley JK. 1994. Peroxisomal beta-oxidation of fatty acids in bovine and rat liver. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 109: 281–292.
- Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. 2005. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 87: 99–109.
- Guertin DA, Sabatini DM. 2007. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell.* 12: 9–22.
- Gümen A, Sartori R, Costa FMJ, Wiltbank MC. 2002a. A GnRH/LH Surge Without Subsequent Progesterone Exposure Can Induce Development of Follicular Cysts. *J Dairy Sci.* 85: 43–50.

- Gümen A, Wiltbank MC. 2002b. An Alteration in the Hypothalamic Action of Estradiol Due to Lack of Progesterone Exposure Can Cause Follicular Cysts in Cattle. *Biol Reprod.* 66: 1689–1695.
- Gutiérrez CG, Oldham J, Bramley TA, Gong JG, Campbell BK, Webb R. 1997. The Recruitment of Ovarian Follicles Is Enhanced by Increased Dietary Intake in Heifers. *J Anim Sci.* 75: 1876–1884.
- Gutierrez CG, Gong JG, Bramley TA, Webb R. 2006. Selection on predicted breeding value for milk production delays ovulation independently of changes in follicular development , milk production and body weight. *Anim Reprod Sci.* 95: 193–205.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ª ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- Hammer GD, McPhee SJ. 2015. Fisiopatología de la enfermedad: una introducción a la medicina Clínica. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS, Salfen BE. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol Reprod.* 53: 890–898.
- Hansel W, Convey EM. 1983. Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci.* 57: 404–424.
- Hardie DG. 2004. The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *J Cell Sci.* 117: 5479–5487.
- Harrison LM, Randel RD. 1986. Influence of insulin and energy intake on ovulation rate, luteinizing hormone and progesterone in beef heifers. *J Anim Sci.* 63: 1228–1235.
- Hatler TB, Hayes SH, Laranja da Fonseca LF, Silvia WJ. 2003. Relationship Between Endogenous Progesterone and Follicular Dynamics in Lactating Dairy Cows with Ovarian Follicular Cysts. *Biol Reprod.* 69: 218–223.
- Hatler TB, Hayes SH, Anderson LH, Silvia WJ. 2006. Effect of a single injection of progesterone on ovarian follicular cysts in lactating dairy cows. *Vet J.* 172: 329–333.
- Hatler TB, Hayes SH, Ray DL, Reames PS, Silvia WJ. 2008. Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. *Vet J.* 177: 360–368.

- Hayirli A. 2006. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet Res Commun.* 30: 749–774.
- Hein GJ, Panzani CG, Rodríguez FM, Salvetti NR, Díaz PU, Gareis NC, Benítez GA, Ortega HH, Rey F. 2015. Impaired insulin signaling pathway in ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci.* 156: 64–74.
- Heinz JFL, Singh SP, Janowitz U, Hoelker M, Tesfaye D, Schellander K, Sauerwein H. 2015. Characterization of adiponectin concentrations and molecular weight forms in serum, seminal plasma, and ovarian follicular fluid from cattle. *Theriogenology.* 83: 326–333.
- Hillier SG. 1994. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod.* 9: 188–191.
- Hillier S, Tetsuka M. 1998. An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries? *J Reprod Immunol.* 39: 21–27.
- Hooijer GA, Lubbers RBF, Ducro BJ, van Arendonk JAM, Kaal-Lansbergen LMTE, van der Lende T. 2001. Genetic Parameters for Cystic Ovarian Disease in Dutch Black and White Dairy Cattle. *J Dairy Sci.* 84: 286–291.
- Hossler FE, 2014. *Ultrastructure Atlas of Human Tissues. Female Reproductive System.* John Wiley & Sons.
- Hu CL, Cowan RG, Harman RM, Quirk SM. 2004. Cell Cycle Progression and Activation of Akt Kinase Are Required for Insulin-Like Growth Factor I-Mediated Suppression of Apoptosis in Granulosa Cells. *Mol Endocrinol.* 18: 326–338.
- Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. 2004. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Nat Academy Sci.* 101(28): 10308–10313.
- Ingvartsen KL, Friggens NC. 2005. To what extent do variabilities in hormones, metabolites and energy intake explain variability in milk yield? *Dom Anim Endocrinol.* 29: 294–304.
- Ireland JJ, Roche JF. 1982. Development of Antral Follicles in Cattle after Prostaglandin-Induced Luteolysis: Changes in Serum Hormones, Steroids in Follicular Fluid, and

- Gonadotropin Receptors. *Endocrinology*. 111: 2077–2086.
- Ireland JJ, Roche JF. 1983. Development of Nonovulatory Antral Follicles in Heifers: Changes in Steroids in Follicular Fluid and Receptors for Gonadotropins. *Endocrinology*. 112: 150–156.
- Isobe N, Yoshimura Y. 2007. Deficient Proliferation and Apoptosis in the Granulosa and Theca Interna Cells of the Bovine Cystic Follicle. *J Reprod Dev*. 53: 1119–1124
- Jackson R, Wills JR, Kendall NR, Green MJ, Murray RD, Dobson H. 2011. Energy metabolites in pre- and postpartum dairy cattle as predictors of reproductive disorders. *Vet Rec*. 168: 562.
- Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Yen HW, Bogusiewicz M, Magoffin DA. 2002. Estrogen Receptor α and β Expression in Theca and Granulosa Cells from Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol*. 87: 5532–5538.
- Jorritsma R, Wensing T, Kruip T, Vos P, Noordhuizen J. 2003. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet Res*. 33: 239–250.
- Jóźwik M, Jóźwik M, Wołczyński S, Jóźwik M, Szamatowicz M. 2001. Ammonia concentration in human preovulatory ovarian follicles. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol*. 94: 256–260.
- Jungheim ES, Macones GA, Odem RR, Patterson BW, Lanzendorf SE, Ratts VS, Moley KH. 2011. Associations between free fatty acids, cumulus oocyte complex morphology and ovarian function during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 95: 1970–1974.
- Kadowaki T, Yamauchi T. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 26:439–451
- Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N. 2008. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett*. 582. 74–80.
- Kakar SS, Rahe CH, Neill JD. 1993. Molecular cloning, sequencing, and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Dom Anim Endocrinol*. 10: 335–342.
- Kawashima C, Fukihara S, Maeda M, Kaneko E, Amaya Montoya C, Matsui M, Shimizu T,

- Matsunaga N, Kida K, Miyake YI, Schams D, Miyamoto A. 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction*. 133: 155–163.
- Kawashima C, Matsui M, Shimizu T, Kida K, Miyamoto A. 2012. Nutritional Factors That Regulate Ovulation of the Dominant Follicle During the First Follicular Wave Postpartum in High-producing Dairy Cows. *J Reprod Dev*. 58: 10–16.
- Kawate N, Inaba T, Mori J. 1990. A quantitative comparison in the bovine of steroids and gonadotropin receptors in normally developing follicles and in follicular and luteinized cysts. *Anim Reprod Sci*. 23: 273–281.
- Kawate N, Inaba T, Mori J. 1996. Changes in Plasma Concentrations of Gonadotropins and Steroid Hormones during the Formation of Bovine Follicular Cysts Induced by the Administration of ACTH. *J Vet Med Sci*. 58: 141–144.
- Kesler DJ, Garverick HA. 1982. Ovarian Cysts in Dairy Cattle: a Review. *J Anim Sci*. 55: 1147–1159.
- Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. 2001. A Cysteine-rich Adipose Tissue-specific Secretory Factor Inhibits Adipocyte Differentiation. *J Biol Chem*. 276: 11252–11256.
- Kim J, Sato M, Li Q, Lydon JP, DeMayo FJ, Bagchi IC, Bagchi MK. 2008. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Is a Target of Progesterone Regulation in the Preovulatory Follicles and Controls Ovulation in Mice. *Mol Cell Biol*. 28: 1770–1782.
- Knight PG, Glister C. 2003. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci*. 78: 165–183.
- Kol S, Ben-Shlomo I, Payne DW, Ando M, Rohan RM, Adashi EY. 1998. Glucocorticoids suppress basal (but not interleukin-1-supported) ovarian phospholipase A2 activity: Evidence for glucocorticoid receptor-mediated regulation. *Mol Cell Endocrinol*. 137: 117–125.
- Konopka C. What Are Lipoproteins? - Definition, Functions & Types. <https://study.com/academy/lesson/what-are-lipoproteins-definition-functions-types.html>. Fecha del último ingreso: 02/11/2018.
- Kor NNM, Moradi K. 2013. A Review of Biochemical Metabolites Concentration and

- Hormonal Composition of Ovarian Follicular Fluid in Domestic Animals. *Annu Rev Res Biol.* 3: 246–255.
- Krasnow SM, Steiner RA. 2006. Physiological mechanisms integrating metabolism and reproduction. En Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Elsevier Inc. 2553–2625
- Kruip TA, Kemp B. 1999. Nutrition and fertility in agricultural domestic animals. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde.* 124: 462–467.
- Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology.* 52: 913–921.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680–685.
- Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA, Hulsey LB, Spicer LJ. 2008. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol Cell Endocrinol.* 284: 38–45.
- Landau S, Braw-Tal R, Kaim M, Bor A, Bruckental I. 2000. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 64: 181–197.
- Laporte H, Hogeveen H, Schukken Y, Noordhuizen JPT. 1994. Cystic ovarian disease in Dutch dairy cattle, I. Incidence, risk factors and consequences. *Livest Prod Sci.* 38: 191–197.
- Leblanc S. 2010. Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in the Transition Period. *J Reprod Dev.* 56: 29–35.
- Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD. 2006. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology.* 147: 5178–5186.
- Lee MH, Klein RL, El-Shewy HM, Luttrell DK, Luttrell LM. 2008. The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth. *Biochemistry.* 47: 11682–11692.
- Leese HJ, Lenton E. 1990. Glucose and lactate in human follicular fluid: concentrations and interrelationships. *Hum Reprod.* 5: 915–919.

- Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, De Kruif A. 2004a. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 80: 201–211.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, Dewulf J, de Kruif A. 2004b. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology.* 62: 1131–1143.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, de Kruif A, Genicot G, Van Soom A. 2005. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction.* 130: 485–495.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Opsomer G, Van Soom A, de Kruif A. 2006. The in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and beta-hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. *Reprod Domestic Anim.* 41: 119–123.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Van Kneegsel ATM, Garcia-Ispuerto I, Bols PEJ. 2008. Nutrient Prioritization in Dairy Cows Early Postpartum: Mismatch Between Metabolism and Fertility? *Reprod Domest Anim.* 43: 96–103.
- Leroy JLMR, Rizos D, Sturmey R, Bossaert P, Gutierrez-Adan A, Van Hoeck V, Valckx S, Bols PEJ. 2012. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: A focus on dairy cow fertility. *Reprod Fertil Dev.* 24: 1–12.
- Liptrap RM, McNally PJ. 1976. Steroid concentrations in cows with corticotropin-induced cystic ovarian follicles and the effect of prostaglandin F₂ alpha and indomethacin given by intrauterine injection. *Am J Vet Res.* 37: 369–375.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 25: 402–408.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yániz J, Fenech M, López-Béjar M. 2002. Risk factors for postpartum ovarian cysts and their spontaneous recovery or persistence in lactating dairy cows. *Theriogenology.* 58: 1623–1632.

- Lucy MC, Jiang H, Kobayashi Y. 2001. Changes in the Somatotrophic Axis Associated with the Initiation of Lactation. *J Dairy Sci.* 84: 113–119.
- Lucy MC. 2003. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction.* 61: 415–427.
- Lucy MC. 2007. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 64: 237–254.
- Luu-The V. 2001. Analysis and characteristics of multiple types of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Bioch Mol Biol.* 76: 143–151.
- Maillard V, Uzbekova S, Guignot F, Perreau C, Ramé C, Coyral-Castel S, Dupont J. 2010. Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. *Reprod Biol Endocrinol.* 8: 23.
- Mansouryar M, Mirzaei-Alamouti H, Dehghan Banadaky M, Sauerwein H, Mielenz M, Nielsen MO. 2018. Short communication: Relationship between body condition score and plasma adipokines in early-lactating Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 101: 8552–8558.
- Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, Fang Q, Christ-Roberts CY, Hong JY, Kim RY, Liu F, Dong LQ. 2006. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nature Cell Biol.* 8: 516–523.
- Mapletoft R. 2003. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev.* 42: 601–611.
- Marelli BE, Diaz PU, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. 2014. MRNA expression pattern of gonadotropin receptors in bovine follicular cysts. *Reprod Biol.* 14: 276–281.
- Marino M, Acconcia F, Trentalance A. 2003. Biphasic Estradiol-induced AKT Phosphorylation Is Modulated by PTEN via MAP Kinase in HepG2 Cells. *Mol Biol Cell.* 14: 2583–2591.
- Matamoros IA, Cox NM, Moore AB. 1990. Exogenous insulin and additional energy affect follicular distribution, follicular steroid concentrations, and granulosa cell human chorionic gonadotropin binding in swine. *Biol Reprod.* 43: 1–7.
- Matiller V, Stangaferro M, Díaz P, Ortega H, Rey, Huber E, Salvetti N. 2014. Altered

- Expression of Transforming Growth Factor-Beta Isoforms in Bovine Cystic Ovarian Disease. *Reprod Domest Anim.* 49: 813–823.
- McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil.* 118: 163–170.
- Mebratu Y, Tesfaigzi Y. 2009. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle.* 8: 1168–1175.
- Michael A, Thurston L, Rae M. 2003. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction.* 126: 425–441.
- Michalakis KG, Segars JH. 2010. The role of adiponectin in reproduction: From polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertil Steril.* 94: 1949–1957.
- Mihm M, Austin EJ, Good TEM, Ireland JLH, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. 2000. Identification of Potential Intrafollicular Factors Involved in Selection of Dominant Follicles in Heifers. *Biol Reprod.* 63: 811–819.
- Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. 2005. Adipokines: Implications for female fertility and obesity. *Reproduction.* 130: 583–597.
- Miyoshi S, Pate JL, Palmquist DL. 2001. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 68: 29–43.
- Moberg GP. 1991. How Behavioral Stress Disrupts the Endocrine Control of Reproduction in Domestic Animals. *J Dairy Sci.* 74: 304–311.
- Moenter S. 1992. Dynamics of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Secretion during the GnRH Surge: Insights into the Mechanism of GnRH Surge Induction. *Endocrinology.* 130: 2978–2984.
- Molter-Gérard C, Caraty A, Guérin S, Fontaine J, Taragnat C. 2000. Dynamic Changes in the Gonadotrope Cell Subpopulations During an Estradiol-Induced Surge in the Ewe. *Biol Reprod.* 63: 1084–1091.
- Monniaux D, Clemente N, Touzé JL, Belville C, Rico C, Bontoux M, Picard JY, Fabre S. 2008. Intrafollicular Steroids and Anti-Müllerian Hormone During Normal and Cystic Ovarian Follicular Development in the Cow. *Biol Reprod.* 79: 387–396.

- Morales Piñeyrúa JT, Fariña SR, Mendoza A. 2018. Effects of parity on productive, reproductive, metabolic and hormonal responses of Holstein cows. *Anim Reprod Sci.* 191: 9–21.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R. 1996. ER β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters.* 392: 49–53.
- Mu YM. 2001. Saturated FFAs, Palmitic Acid and Stearic Acid, Induce Apoptosis in Human Granulosa Cells. *Endocrinology.* 142: 3590–3597.
- Nadaraja R, Hansel W. 1976. Hormonal changes associated with experimentally produced cystic ovaries in the cow. *J Reprod Fertil.* 47: 203–208.
- Nakao T, Grunert E. 1990. Effects of Dystocia on Postpartum Adrenocortical Function in Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 73: 2801–2806.
- Nandi S, Kumar VG, Manjunatha BM, Gupta PSP. 2007. Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. *Develop Growth Differ.* 49: 61–66.
- Nelson ST, Martin AD, Østerås O. 2010. Risk factors associated with cystic ovarian disease in Norwegian dairy cattle. *Acta Vet Scand.* 52: 60.
- Nishimoto H, Matsutani R, Yamamoto S, Takahashi T, Hayashi KG, Miyamoto A, Hamano S, Tetsuka M. 2006. Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol.* 188: 111–119.
- Niswender GD, Suter DE, Sawyer HR. 1981. Factors regulating receptors for LH on ovine luteal cells. *J Reprod Fertil.* 30: 183–189.
- Nixon DA, Akasha MA, Anderson RR. 1988. Free and total thyroid hormones in serum of Holstein cows. *J Dairy Sci.* 71: 1152–1160.
- Ohtani Y, Takahashi T, Sato K, Ardiyanti A, Song SH, Sato R, Onda K, Wada Y, Obara Y, Suzuki K, Hagino A, Roh S, Katoh K. 2012. Changes in circulating adiponectin and metabolic hormone concentrations during periparturient and lactation periods in Holstein dairy cows. *Anim Sci J.* 83: 788–795.
- Okuda Y, Okamura H, Kanzaki H, Takenaka A, Morimoto K, Nishimura T. 1982. An ultrastructural study of capillary permeability of rabbit ovarian follicles using horseradish peroxidase as a tracer. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 34: 181–186.

- Olivares Reyes JA, Arellano Plancarte A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*. 27: 9–18.
- Oliveira BSP, Costa JAS, Gomes ET, Silva DMF, Torres SM, Monteiro PLJ Jr, Santos AS Jr, Guerra MMP, Carneiro GF, Wischral A, Batista AM. 2017. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in goat ovary and its effect on oocyte nuclear maturation in vitro. *Theriogenology*. 104: 127–133.
- Opsomer G, Mijten P, Coryn M, de Kruif A. 1996. Post-partum anoestrus in dairy cows: A review. *Vet Q*. 18: 68–75.
- Opsomer G, Wensing T, Laevens H, Coryn M, De Kruif A. 1999. Insulin resistance: The link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows? *Anim Reprod Sci*. 56: 211–222.
- Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2008. Insulin-like growth factor I in sera, ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous or induced cystic ovarian disease. *Res Vet Sci*. 84: 419–427.
- Ortega HH, Salvetti NR, Padmanabhan V. 2009. Developmental programming: Prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction*. 137: 865–877.
- Ortega HH, Rey F, Velazquez MML, Padmanabhan V. 2010. Developmental Programming: Effect of Prenatal Steroid Excess on Intraovarian Components of Insulin Signaling Pathway and Related Proteins in Sheep. 1075: 1065–1075.
- Ortega HH, Marelli BE, Rey F, Amweg AN, Díaz PU, Stangaferro ML, Salvetti NR. 2015. Molecular aspects of bovine cystic ovarian disease pathogenesis. *Reproduction*. 149: 251–264.
- Ortega HH, Díaz PU, Salvetti NR, Hein GJ, Marelli BE, Rodríguez FM, Stassi A, Rey F. 2016. Follicular Cysts: A Single Sign and Different Diseases. A View from Comparative Medicine. *Curr Pharm Des*. 22: 5634–5645.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M. 2001. Lipid Accumulation and Class A Scavenger Receptor. *Circulation*. 103: 1057–1063.
- Paczkowski M, Silva E, Schoolcraft WB, Krisher RL. 2013. Comparative Importance of

- Fatty Acid Beta-Oxidation to Nuclear Maturation, Gene Expression, and Glucose Metabolism in Mouse, Bovine, and Porcine Cumulus Oocyte Complexes. *Biol Reprod.* 88: 1–11.
- Palaniappan M, Menon B, Menon KMJ. 2013. Stimulatory effect of insulin on theca-interstitial cell proliferation and cell cycle regulatory proteins through MTORC1 dependent pathway. *Mol Cell Endocrinol.* 366: 81–89.
- Panidis D, Kourtis A, Farmakiotis D, Mouslech T, Rousso D, Koliakos G. 2003. Serum adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 18: 1790–1796.
- Parrott JA, Skinner MK. 1998. Developmental and hormonal regulation of hepatocyte growth factor expression and action in the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod.* 59: 553–560.
- Peter A. 2004. An Update on Cystic Ovarian Degeneration in Cattle. *Reprod Domest Anim.* 39: 1–7.
- Pettersson K. 1997. Mouse Estrogen Receptor Forms Estrogen Response Element-Binding Heterodimers with Estrogen Receptor. *Mol Endocrinol.* 11: 1486–1496.
- Phillips DJ, De Kretser DM. 1998. Follistatin: A multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol.* 19: 287–322.
- Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. 1999. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev.* 20: 535–582.
- Probo M, Comin A, Cairoli F, Faustini M, Kindahl H, De Amicis I, Veronesi MC. 2011. Selected metabolic and hormonal profiles during maintenance of spontaneous ovarian cysts in dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 46: 448–454.
- Pryce JE, Coffey MP, Simm G. 2001. The Relationship Between Body Condition Score and Reproductive Performance. *J Dairy Sci.* 84: 1508–1515.
- Pryce JE, Royal MD, Garnsworthy PC, Mao IL. 2004. Fertility in the high-producing dairy cow. *Livest Prod Sci.* 86: 125–135.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF $_{2\alpha}$ and GnRH. *Theriogenology.* 44: 915–923.

- Qaid MM, Abdelrahman MM. 2016. Role of insulin and other related hormones in energy metabolism. A review. *Cogent Food Agric.* 2: 1–18.
- Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM, Miller BG, Scaramuzzi RJ. 1997. An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous difference methods in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 48: 9–25.
- Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM. 1999. Relationships Among Metabolites Influencing Ovarian Function. *J Dairy Sci.* 82: 39–44.
- Rahe CH, Owens RE, Fleeger JL, Newton HJ, Harms PG. 1980. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: Dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology.* 107: 498–503.
- Rajakoski E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Eu J Endocrinol.* 34(3): 7–68.
- Rajala PJ, Gröhn YT. 1998. Effects of Dystocia, Retained Placenta, and Metritis on Milk Yield in Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 81: 3172–3181.
- Reddy P, Adhikari D, Zheng W, Liang S, Hämäläinen T, Tohonen V, Ogawa W, Noda T, Volarevic S, Huhtaniemi I, Liu K. 2009. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Hum Mol Gen.* 18: 2813–2824.
- Refsal KR, Jarrin-Maldonado JH, Nachreiner RF. 1987. Endocrine profiles in cows with ovarian cysts experimentally induced by treatment with exogenous estradiol or adrenocorticotrophic hormone. *Theriogenology.* 28: 871–889.
- Refsal KR, Jarrin-Maldonado JH, Nachreine RF. 1988. Basal and estradiol-induced release of gonadotropins in dairy cows with naturally occurring ovarian cysts. *Theriogenology.* 30: 679–693.
- Relling A, Mattioli G. 2002. Fisiología digestiva, procesos fermentativos en el estomago, abrsorcion y destino metabolico de los rumiantes. *Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes.* Editorial EDULP. 4–72.
- Renaville B, Bacciu N, Comin A, Motta M, Poli I, Vanini G, Prandi A. 2010. Plasma and follicular fluid fatty acid profiles in dairy cows. *Reprod Domestic Anim.* 45: 118–

121.

- Revah I, Butler WR. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 106: 39–47.
- Reverchon M, Ramé C, Bertoldo M, Dupont J. 2014. Adipokines and the female reproductive tract. *Int J Endocrinol.* 1–10.
- Rey F, Rodríguez FM, Salvetti NR, Palomar MM, Barbeito CG, Alfaro NS, Ortega HH. 2010. Insulin-Like Growth Factor-II and Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in Bovine Cystic Ovarian Disease. *J Comp Pathol.* 142: 193–204.
- Richards JS. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev.* 15: 725–751.
- Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN. 1998. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol Cell Endocrinol.* 145: 47–54.
- Richards JS, Pangas SA. 2010. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.* 120: 963–972.
- Rippe CA. 2009. El ciclo estral. Dairy Cattle Reproduction Council. Dairy Cattle Reproduction Conference. Minneapolis, Minnesota y Boise, Idaho. 111-115
- Rivera GM, Fortune JE. 2003. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins-4 and -5 in bovine follicular fluid: Implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology.* 144: 2977–2987.
- Robker RL, Akison LK, Bennett BD, Thrupp PN, Chura LR, Russell DL, Lane M, Norman RJ. 2009. Obese Women Exhibit Differences in Ovarian Metabolites, Hormones, and Gene Expression Compared with Moderate-Weight Women. *J Clin Endocrinol Metabol.* 94: 1533–1540.
- Roche JF. 1996. Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. *Rev Reprod.* 1: 19–27.
- Roche JF. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci.* 96: 282–296.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. 2010. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol Reprod.* 82: 1021–1029.

- Rodríguez FM, Colombero M, Amweg AN, Huber E, Gareis NC, Salvetti NR, Ortega HH, Rey F. 2015. Involvement of PAPP-A and IGFR1 in Cystic Ovarian Disease in Cattle. *Reprod Domest Anim.* 50: 659–668.
- Romaniuk J. 1972. Incidence and treatment of ovarian cysts in cows. *Bulletin.*
- Ross M, Kaye GY, Pawlina W. 2004. *Electronic Image Collection for Histology. A text and Atlas with cell and molecular biology.* Editores: Lippincot Williams and Wilkins. 4ta Edición.
- Roth Z, Biran D, Lavon Y, Dafni I, Yakobi S, Braw-Tal R. 2012. Endocrine milieu and developmental dynamics of ovarian cysts and persistent follicles in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 95: 1729–1737.
- Royal M, Mann GE, Flint APF. 2000. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *Vet J.* 160: 53–60.
- Ruan H, Dong LQ. 2016. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol.* 8: 101–109.
- Rui L, Dunaif A, White MF, Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, Dunaif A, White MF. 2001. Insulin / IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser 307 via distinct pathways Find the latest version : Insulin / IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser 307 via distinct pathways. *J Clin Invest.* 107: 181–189.
- Ryan KE, Glister C, Lonergan P, Martin F, Knight PG, Evans AC. 2008. Functional significance of the signal transduction pathways Akt and Erk in ovarian follicles: in vitro and in vivo studies in cattle and sheep. *J Ovarian Res.* 1: 2.
- Sahmi M, Nicola ES, Silva JM, Price CA. 2004. Expression of 17 β - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 223: 43–54.
- Salvetti NR, Acosta JC, Gimeno EJ, Müller LA, Mazzini RA, Taboada AF, Ortega, HH. 2007a. Estrogen Receptors α and β and Progesterone Receptors in Normal Bovine Ovarian Follicles and Cystic Ovarian Disease. *Vet Pathol.* 44: 373–378.
- Salvetti NR, Rey F, Ortega H H. 2007b. Enfermedad quística ovárica bovina. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias.* 6: 72-87.

- Salvetti NR, Alfaro NS, Velázquez MML, Amweg AN, Matiller V, Díaz PU, Ortega HH. 2012. Alteration in localization of steroid hormone receptors and coregulatory proteins in follicles from cows with induced ovarian follicular cysts. *Reproduction*. 144: 723–735.
- Salvetti NR, Baravalle C, Mira GA, Gimeno EJ, Dallard BE, Rey F, Ortega HH. 2009. Heat shock protein 70 and sex steroid receptors in the follicular structures of induced ovarian cysts. *Reprod Domest Anim*. 44: 805–814.
- Salvetti NR, Stangaferro ML, Palomar MM, Alfaro NS, Rey F, Gimeno EJ, Ortega HH. 2010. Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Anim Reprod Sci*. 122: 98–110.
- Sanchez-Lazo L, Brisard D, Elis S, Maillard V, Uzbekov R, Labas V, Desmarchais A, Papillier P, Monget P, Uzbekova S. 2014. Fatty Acid Synthesis and Oxidation in Cumulus Cells Support Oocyte Maturation in Bovine. *Mol Endocrinol*. 28: 1502–1521.
- Santos JEP, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Staples CR, Thatcher WW. 2010. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. *Reprod Domestic Anim*. 7: 387–403.
- Sauerwein H, Häußler S. 2016. Endogenous and exogenous factors influencing the concentrations of adiponectin in body fluids and tissues in the bovine. *Dom Anim Endocrinol*. 56: 33–43.
- Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*. 83: 663–671.
- Sayasith K, Sirois J. 2015. Molecular characterization of a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17) in granulosa cells of bovine preovulatory follicles. *Mol Cell Endocrinol*. 411: 49–57.
- Scaramuzzi RJ, Brown HM, Dupont J. 2010. Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: A perspective. *Reprod Domest Anim*. 45: 32–41.
- Scaramuzzi RJ, Zouaïdi N, Menassol JB, Dupont J. 2015. The effects of intravenous,

- glucose versus saline on ovarian follicles and their levels of some mediators of insulin signalling. *Reprod Biol Endocrinol*. 13: 1–14.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Andrade ER, Binell M, Oliveira JA, Nascimento AB. 2003. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*. 59: 1435–1440.
- Seto-Young D, Avtanski D, Strizhevsky M, Parikh G, Patel P, Kaplun J, Poretsky L. 2007. Interactions among peroxisome proliferator activated receptor-gamma, insulin signaling pathways, and steroidogenic acute regulatory protein in human ovarian cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 92: 2232–2239.
- Shaham-Albalancy A, Rosenberg M, Folman Y, Graber Y, Meidan R, Wolfenson D. 2000. Two Methods of Inducing Low Plasma Progesterone Concentrations Have Different Effects on Dominant Follicles in Cows. *J Dairy Sci*. 83: 2771–2778.
- Shalgi R, Kraicer P, Rimon A, Pinto M, Soferman N. 1973. Proteins of Human Follicular Fluid: The Blood-Follicle Barrier. *Fertil Steril*. 24: 429–434.
- Shehab-El-Deen MAMM, Leroy JLMR, Fadel MS, Saleh SYA, Maes D, Van Soom A. 2010. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early post-partum. *Anim Reprod Sci*. 117: 189–200.
- Shimizu T, Murayama C, Sudo N, Kawashima C, Tetsuka M, Miyamoto A. 2008. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Anim Reprod Sci*. 106: 143–152.
- Shushan A, Peretz T, Uziely B, Lewin A, Mor-Yosef S. 1996. Ovarian cysts in premenopausal and postmenopausal tamoxifen-treated women with breast cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 174: 141–144.
- Silva JM, Price CA. 2002. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *J Endocrinol*. 174: 499–507.
- Silva JM, Hamel M, Sahmi M, Price CA. 2006. Control of oestradiol secretion and of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid accumulation by FSH involves different intracellular pathways in oestrogenic bovine granulosa cells in

- vitro. *Reproduction*. 132: 909–917.
- Silvia WJ, Hatler TB, Nugent AM, Fonseca LFL. 2002. Ovarian follicular cysts in dairy cows : An abnormality in folliculogenesis. *Dom Anim Endocrinol*. 23: 167–177.
- Simpson RB, Chase CC, Spicer LJ, Vernon RK, Hammond AC, Rae DO. 1994. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *Reproduction*. 102: 483–492.
- Simpson ER, Davis SR. 2001. Minireview: Aromatase and the Regulation of Estrogen Biosynthesis—Some New Perspectives. *Endocrinology*. 142: 4589–4594.
- Sinclair KD, Molle G, Revilla R, Roche JF, Quintans G, Marongiu L, Sanz A, Mackey DR, Diskin MG. 2002. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 post partum in suckling beef cows. *Anim Sci*. 75: 115–126.
- Sirois J, Fortune JE. 1990. Lengthening the Bovine Estrous Cycle with Low Levels of Exogenous Progesterone: A Model for Studying Ovarian Follicular Dominance. *Endocrinology*. 127: 916–925.
- Sisson S, Grossman JD. 1982. *Anatomía de los animales domésticos*. 5ta Edición. Salvat Editores S.A. Barcelona, España.
- Smitz J, Cortvrindt R. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*. 123: 185–202.
- Snijders SEM, Dillon PG, O'Farrell KJ, Diskin M, Wylie ARG, O'Callaghan D, Rath M, Boland MP. 2001. Genetic merit for milk production and reproductive success in dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 65: 17–31.
- Welsch U, Sobotta J. 2008. *Histología*. 2da. Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Sordillo LM, Aitken SL. 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet Immunol Immunopath*. 128: 104–109.
- Spicer LJ, Tucker WB, Adams GD. 1990. Insulin-Like Growth Factor-I in Dairy Cows: Relationships Among Energy Balance, Body Condition, Ovarian Activity, and Estrous Behavior. *J Dairy Sci*. 73: 929–937.

- Spicer LJ, Alpizar E, Echternkamp SE. 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J Anim Sci.* 71: 1232–1241.
- Spicer LJ, Alpizar E, Vernon RK. 1994. Insulin-like growth factor-I receptors in ovarian granulosa cells: Effect of follicle size and hormones. *Mol Cell Endocrinol.* 102: 69–76.
- Spicer LJ, Echternkamp SE. 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Dom Anim Endocrinol.* 12: 223–245.
- Spicer LJ, Chamberlain CS. 1998. Influence of cortisol on insulin- and insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-induced steroid production and on IGF-1 receptors in cultured bovine granulosa cells and thecal cells. *Endocrine.* 9: 153–161.
- Spicer LJ, Chamberlain CS, Maciel SM. 2002. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Dom Anim Endocrinol.* 22: 237–254.
- Stangaferro ML, Matiller V, Díaz PU, Ortega HH, Rey F, Rodríguez FM, Silva MA, Salvetti NR. 2014. Role of activin, inhibin, and follistatin in the pathogenesis of bovine cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci.* 148: 97–108.
- Stassi AF, Baravalle ME, Belotti EM, Rey F, Gareis NC, Díaz PU, Rodríguez FM, Leiva CJ, Ortega HH, Salvetti NR. 2017. Altered expression of cytokines IL-1 α , IL-6, IL-8 and TNF- α in bovine follicular persistence. *Theriogenology.* 97: 104–112.
- Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE. 1995. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *J Anim Sci.* 73: 3719–3731.
- Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR. 2005. Multiple Signaling Pathways Regulating Steroidogenesis and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression: More Complicated than We Thought. *Mol Endocrinol.* 19: 2647–2659.
- Stocco C. 2008. Aromatase expression in the ovary: Hormonal and molecular regulation. *Steroids.* 73: 473–487.

- Stock AE, Fortune JE. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*. 132: 1108–1114.
- Sturmey RG, Leese HJ. 2003. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction*. 126: 197–204.
- Sturmey RG, Reis A, Leese HJ, McEvoy TG. 2009. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Domest Anim*. 44: 50–58.
- Sunderland SJ, Crowe M, Boland, MP, Roche JF, Ireland JJ. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*. 101: 547–555.
- Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2010. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*. 139: 685–695.
- Tabandeh MR, Hosseini A, Saeb M, Kafi M, Saeb S. 2010. Changes in the gene expression of adiponectin and adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in ovarian follicular cells of dairy cow at different stages of development. *Theriogenology*. 73: 659–669.
- Tabatabaei S, Mamoei M, Aghaei A. 2011. Dynamics of ovarian follicular fluid in cattle. *Comp Clin Pathol*. 20: 591–595.
- Tajima K, Yoshii K, Fukuda S, Orisaka M, Miyamoto K, Amsterdam A, Kotsuji F. 2005. Luteinizing hormone-induced extracellular-signal regulated kinase activation differently modulates progesterone and androstenedione production in bovine theca cells. *Endocrinology*. 146: 2903–2910.
- Taketani T, Yamagata Y, Takasaki A, Matsuoka A, Tamura H, Sugino N. 2008. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 on progesterone production in human luteinized granulosa cells. *Fertil Steril*. 90: 744–748.
- Tanaka T, Nagatani S, Bucholtz DC, Ohkura S, Tsukamura H, Maeda K, Foster DL. 2000. Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. *Biol Reprod*. 62: 1256–1261.

- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. 2006. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 85-96.
- Thundyil J, Pavlovski D, Sobey CG, Arumugam TV. 2012. Adiponectin receptor signalling in the brain. *Br J Pharmacol.* 165: 313–327.
- Tosca L, Solnais P, Ferré P, Fougelle F, Dupont J. 2006. Metformin-Induced Stimulation of Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase (PRKA) Impairs Progesterone Secretion in Rat Granulosa Cells. *Biol Reprod.* 75: 342–351.
- Tosca L, Chabrolle C, Dupont J. 2008. [AMPK: a link between metabolism and reproduction?]. *Med Sci.* 24: 297–300.
- Toulis KA, Goulis DG, Farmakiotis D, Georgopoulos NA, Katsikis I, Tarlatzis BC, Papadimas I, Panidis D. 2009. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and a meta-analysis. *Human Reproduction Update.* 15: 297-307.
- Valckx SDM, De Pauw I, De Neubourg D, Inion I, Berth M, Fransen E, Bols PEJ, Leroy JLMR. 2012. BMI-related metabolic composition of the follicular fluid of women undergoing assisted reproductive treatment and the consequences for oocyte and embryo quality. *Hum Reprod.* 27: 3531–3539.
- Valckx SDM, Arias-Alvarez M, De Pauw I, Fievez V, Vlaeminck B, Fransen E, Bols PEJ, Leroy JLMR. 2014. Fatty acid composition of the follicular fluid of normal weight, overweight and obese women undergoing assisted reproductive treatment: A descriptive cross-sectional study. *Reprod Biol Endocrinol.* 12: 1–11.
- Van Hoeck V, Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Leese HJ, Leroy JLMR. 2011. Elevated Non-Esterified Fatty Acid Concentrations during Bovine Oocyte Maturation Compromise Early Embryo Physiology. *PloS one.* 6: e23183.
- Van Hoeck V, Bols PEJ, Binelli M, Leroy JLMR. 2014. Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: A possible pathway to subfertility? *Anim Reprod Sci.* 149: 19–29.
- van Kneysel ATM, van den Brand H, Graat EAM, Dijkstra J, Jorritsma R, Decuypere E, Tamminga S, Kemp B. 2007. Dietary Energy Source in Dairy Cows in Early Lactation: Metabolites and Metabolic Hormones. *J Dairy Sci.* 90: 1477–1485.

- van Montfoort APA, Plösch T, Hoek A, Tietge UJF. 2014. Impact of maternal cholesterol metabolism on ovarian follicle development and fertility. *J Reprod Immunol.* 104–105: 32–36.
- Vanholder T, Leroy JLMR, Dewulf J, Duchateau L, Coryn M, De Kruif A, Opsomer G. 2005a. Hormonal and metabolic profiles of high-yielding dairy cows prior to ovarian cyst formation or first ovulation post partum. *Reprod Domest Anim.* 40: 460–467.
- Vanholder T, Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G, Maes D, Coryn M, De Kruif A. 2005b. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. *Anim Reprod Sci.* 87: 33–44.
- Vanholder T, Opsomer G, de Kruif A. 2006. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nut Dev.* 44: 105–119.
- Veech RL. 2004. The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 70: 309–319.
- Veerkamp RF, Beerda B, Van Der Lende T. 2003. Effects of genetic selection for milk yield on energy balance, levels of hormones, and metabolites in lactating cattle, and possible links to reduced fertility. *Livest Prod Sci.* 83: 257–275.
- Velazquez MA, Spicer LJ, Wathes DC. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Dom Anim Endocrinol.* 35: 325–342.
- Velázquez MML, Alfaro NS, Salvetti NR, Stangaferro ML, Rey F, Panzani CG, Ortega HH. 2011. Levels of heat shock protein transcripts in normal follicles and ovarian follicular cysts. *Reprod Biol.* 11: 276–283.
- Velázquez MML, Salvetti NR, Amweg AN, Díaz PU, Matiller V, Ortega HH. 2013. Changes in the expression of Heat Shock Proteins in ovaries from bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Res Vet Sci.* 95: 1059–1067.
- Vernon RG. 2005. Lipid metabolism during lactation: A review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J Dairy Res.* 72: 460–469.
- Wade GN, Schneider JE. 1992. Metabolic fuels and reproduction in female mammals. *Neurosci Biobehav Rev.* 16: 235–272.

- Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. 2003. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem.* 278: 40352–40363.
- Wang X, Zou P, He Y, Meng K, Quan F, Zhang Y. 2018. Effect of luteinizing hormone on goat theca cell apoptosis and steroidogenesis through activation of the PI3K/AKT pathway. *Anim Reprod Sci.* 190: 108–118.
- Webb R, Garnsworthy PC, Gong J, Armstrong DG. 2004. Control of follicular growth : Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci.* 82: 63–74.
- Webb R, Campbell B. 2007. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 64: 141–163.
- Weck J, Fallest PC, Pitt LK, Shupnik MA. 1998. Differential Gonadotropin-Releasing Luteinizing Hormone Subunit Gene Transcription by Calcium Influx and Signaling Pathways. *Mol Endocrinol.* 12: 451–457.
- Wehrman ME, Welsh TH, Williams GL. 1991. Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulates ovarian follicular dynamics, and hastens the onset of postpartum luteal activity. *Biol Reprod.* 45: 514–522.
- Willis D, Mason H, Gilling-Smith C, Franks S. 1996. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 302–309.
- Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology.* 57: 21–52.
- Winters TA, Cook DL, Callahan CJ, Allrich RD. 1986. Induction of ovarian cysts in cattle by injection of progesterone and oestradiol-17 β . *J Anim Sci.* 63: 361.
- Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist R. 1995. Expression of Messenger Ribonucleic Acid Encoding Cytochrome P450 Side-Chain Cleavage, Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase, and Cytochrome P450 Aromatase in Bovine Follicles during the First Follicular Wave. *Endocrinology.* 136: 981–989.
- Yaba A, Bianchi V, Borini A, Johnson J. 2008. A Putative Mitotic Checkpoint Dependent on

- mTOR Function Controls Cell Proliferation and Survival in Ovarian Granulosa Cells. *Reprod Sci.* 15: 128–138.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchihata, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizuk T, Nagai R, Kadowaki, T. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 423: 762–769.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Med.* 8: 1288–1295.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.* 7: 941–946.
- Youngren JF. 2007. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci.* 64: 873–891.
- Zaied AA, Garverick HA, Kesler DJ, Bierschwal CJ, Elmore RG, Youngquist RS. 1981. Luteinizing hormone response to estradiol benzoate in cows postpartum and cows with ovarian cysts. *Theriogenology.* 16: 349–358.
- Zhao FQ, Dixon WT, Kennelly JJ. 1996. Localization and gene expression of glucose transporters in bovine mammary gland. *Comp Biochem Physiol.* 115: 127–134.
- Zheng W, Nagaraju G, Liu Z, Liu K. 2012. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Mol Cell Endocrinol.* 356: 24–30.
- Zulu VC, Sawamukai Y, Nakada K, Kida K, Moriyoshi M. 2002. Relationship among insulin-like growth factor-I, blood metabolites and postpartum ovarian function in dairy cows. *J Vet Med Sci.* 64: 879–885.

